

SÉRIE A, n° 2664

N° D'ORDRE :

3536

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JEAN VERRIER

1^{re} THÈSE. — RÔLE DES MÉTAUX DANS L'ACTIVITÉ ET LA
STRUCTURE DE L'ARGINASE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 14 mai 1954 devant la Commission d'examen

M. WURMSER *Président.*

M. LAFFITTE
M. FROMAGEOT } *Examineurs.*

IMPRIMERIE A. LAPIED
24, Rue Monsieur-le-Prince, Paris

1954

SÉRIE A, N° 2664

N° D'ORDRE :

3536

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JEAN VERRIER

1^{re} THÈSE. — RÔLE DES MÉTAUX DANS L'ACTIVITÉ ET LA
STRUCTURE DE L'ARGINASE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 14 mai 1954 devant la Commission d'examen

M. WURMSER *Président.*

M. LAFFITTE }
M. FROMAGEOT } *Examineurs.*

IMPRIMERIE A. LAPIED

24, Rue Monsieur-le-Prince, Paris

1954

THESES

A JOURNAL OF THE
INSTITUTE OF THE

INSTITUTE OF THE

LEIDEN



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen

J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LUCAS	T	Physique.
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions.	A. THOMAS	T	
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	ARNULF		Optique appliquée.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	MAX MORAND ..		Physique.
Robert LÉVY ..	T	Physiologie comparée.	SOLEILLET		Physique.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER ..	T	Electrotechnique générale.	DANJON	T	Astronomie.
De BROGLIE	T	Théories physiques.	FROMAGEOT	T	Chimie Biologique.
JOB	T	Chimie générale.	LAPORTE	T	Physique générale et Radio-activité.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	JANET	T	Mécanique analytique et mécanique céleste
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	PETIT	T	Biologie maritime.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	GALLIEN	T	Biologie animale (P.C.B.).
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).	EICHHORN		Biologie végétale (P.C.B.).
G. RIBAUD	T	Hautes températures.	DE CUGNAC		Biologie végétale (P.C.B.).
GROZE	T	Physique théorique et physique céleste.	M ^{lle} CAUCHOIS ..	T	Chimie-Physique.
DUPONT	T	Théories chimiques.	THELLIER		Physique du Globe.
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	AUDUBERT		Electrochimie.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	L'HÉRITIER ...		Génétique.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	GRIVET	T	Radio Electricité.
J. BOURCART ..	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	PONCIN		Mécanique des fluides.
AUBEL	T	Chimie biologique.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
M ^{me} JOLIO-CURIE	T	Physique générale et Radioactivité.	DUBREIL		Mathématiques générales.
PLANTEFOL	T	Botanique.	QUELET		Chimie (P.C.B.).
CABANNES	T	Recherches physiques.	CAGNIARD		Géophysique appliquée.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	CHAMPETIER ...		Chimie macromoléculaire.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	CUVILLIER		Géologie structurale et Géologie appliquée.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	JUNG	T	Pétrographie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	TRILLAT		Chimie physique.
WYART	T	Minéralogie.	WIEMANN		Chimie (P.C.B.).
TEISSIER	T	Zoologie.	JACQUINOT	T	Physique (P.C.B.).
MANGENOT	T	Biologie végétale.	VASSY		Physique de l'Atmosphère.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.	DESTOUCHES ...		Théories Physiques.
MONNIER		Physiologie générale.	M. PRUVOST ..	T	Géologie.
PIVETEAU	T	Géologie.	AMIEL		Chimie (P.C.B.)
ROCARD	T	Physique.	HOCART		Minéralogie
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N. Sup.)	J.-P. MATHIEU ..		Physique (P.C.B.)
LAFFITTE	T	Chimie générale.	COUTEAUX		Biologie animale (P.C.B.)
FAVARD	T	Mécanique générale.	MAY		Biologie animale (P.C.B.)
COULOMB	T	Physique du Globe.	CHOQUET		Calcul différentiel.
M ^{lle} COUSIN ..	T	Biologie animale (P.C.B.).	FELDMANN		Biologie (P.C.B.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	GUINIER		Physique (P.C.B.).
P. DRACH	T	Zoologie.	JOST		Biologie (P.C.B.).
KASTLER	T	Physique.	SCHWARTZ	T	Méthode mathématique de la Physique.
EPHROSSI	T	Génétique.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique	MALAVARD	T	Aviation.
BAUER	T	Chimie-Physique.	BRELOT	T	Calcul différentiel.
RIVIÈRE		Géologie (P.C.B.).	NORMANT	T	Chimie (P.C.B.)
GAUTHERET ...	T	Biologie Végétale (P.C.B.).	BÉNARD		Chimie (P.C.B.)
			BUVAT		Botanique (E.N.S.)
			DUGUE		Statistique mathématique.
			GELOSO		Chimie (P.C.B.)
			MARÉCHAL		Optique théorique, appliquée.
			SOULAIRAC		Psychophysiologie.
			ULRICH		Physiologie végétale.

Secrétaire Ch. MONIER

à la mémoire de mon père

à ma femme

à mes fils

à ma mère

I N T R O D U C T I O N

L'existence dans tous les organismes actuellement étudiés, végétaux et animaux, de traces de métaux tels que le fer, le cuivre, le cobalt, le manganèse, le nickel, le zinc..., s'explique par la participation de ces éléments à de nombreux processus enzymatiques. Cette participation peut avoir lieu sous des formes très différentes : Certaines protéines peuvent former des complexes métalloprotéiques dans lesquels leur stabilité s'accroît notablement. Cette influence du métal sur la stabilité de la protéine peut se traduire par une résistance de la protéine à des phénomènes de dénaturation ou d'hydrolyse enzymatique : c'est le cas du lysozyme que le manganèse protège contre l'inactivation par la chaleur-GORINI et FELIX (68) - et contre l'action hydrolysante de la trypsine-GORINI, FELIX et FROMAGEOT (69). Elle peut se traduire également dans le cas d'une protéine enzymatique par le maintien de l'activité : ainsi le calcium assure-t-il l'activité de protéinases bactériennes-GORINI (66), de la trypsine-BIER et NORD (23), GORINI (67) - et de l' α -amylase-HULTIN (104).

Mais, en dehors de ce rôle de stabilisateur, les métaux peuvent intervenir beaucoup plus directement dans des réactions enzymatiques : on a alors des enzymes à constituant métallique actif dissociable.

A/- Définition et classification des enzymes à constituant métallique actif dissociable.-

BERTRAND ayant été conduit en 1894 "à considérer la laocase comme une combinaison facilement hydrolysable du manganèse avec une substance colloïdale" (22), en conclut alors que le produit actif était formé de deux substances : une complémentaire active ou coferment, le manganèse, qui participerait directement à l'oxydation; une complémentaire activante, partie organique, support du catalyseur métallique, dont elle exalterait l'activité (20) (21).

Cette conception fut étendue sur un plan général et ce n'est qu'en 1923 que WARBURG et SAKUMA (238) formulèrent la notion d'enzyme à métal dissociable pour rendre compte de la structure générale d'un type d'enzyme. Ils postulèrent que "lorsque des formateurs de complexes aussi différents que les pyrophosphates, l' $\alpha\alpha$ '-dipyridyl, la cystéine, inhibent un enzyme, il en résulte :

- 1°- que le ferment est une combinaison de métal lourd,
- 2°- que le ferment est une combinaison dissociable de métal lourd, dont le métal se détache lorsque la concentration en celui-ci dans le milieu devient trop faible". En 1943, lorsque WARBURG et CHRISTIAN (237) donnèrent cette forme à leur postulat, ils signalèrent qu'il n'avait jamais été mis en défaut depuis 1923.

En 1944, ROCHE (177) précisa et compléta ainsi cette définition : "lorsqu'un enzyme peut être inhibé par des corps formant des complexes avec les métaux, par dialyse, et réactivé par des ions métalliques, il en découle que cet enzyme (EM) renferme un métal dissociable (M) combiné à une protéine (E), conjuguée ou non à un coenzyme organique".

L'étude de ces enzymes amena leur répartition entre deux classes distinctes : l'une est caractérisée par la spécificité étroite du constituant minéral, dont le degré de disso-

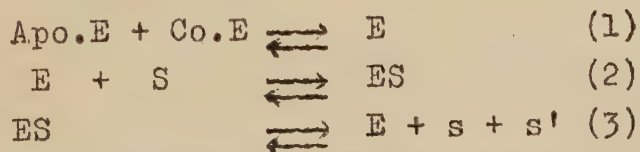
ciation est très faible, sinon nul, au pH cellulaire - telles sont les polyphénoloxydases (cuivriques) et l'anhydrase carbonique (zincique); l'autre comporte des enzymes dont l'activité est liée à un groupe de métaux, interchangeables entre eux - tel est le cas de la carboxylase, de l'énolase, de l'arginase, des zymohexases, de certaines peptidases et des phosphatases alcalines.

Les récentes acquisitions sur la biochimie de ces derniers enzymes ont été exposées dans de nombreuses monographies. ROCHE (177), LEHNINGER (132), BRACKMAN (26) et NAJJAR (163) les ont rassemblées et interprétées. Nous essaierons de dégager la représentation que l'on peut avoir actuellement du rôle du métal.

B/- Rôle du métal dans les enzymes à métal expérimentalement interchangeable.-

On fut d'abord amené à considérer le métal comme catalytiquement actif; mais le manque de spécificité du métal cadre mal avec ce rôle coenzymatique. Les recherches d'HELLERMAN et STOCK (94) destinées à étudier les combinaisons du manganèse comme modèles d'arginase furent absolument vaines, et le même échec se répéta pour tous les enzymes du même groupe cité plus haut; aussi abandonna-t-on le point de vue initial. On se contente souvent depuis lors d'attribuer au métal le rôle de "stabilisateur" de la molécule enzymatique, comme dans le cas du magnésium pour la carboxylase (74), mais il n'est pas besoin de souligner l'imprécision de ce concept.

Si l'on considère la succession des équilibres qui régissent la catalyse enzymatique :



c'est le plus probablement dans la formation de l'enzyme à partir de ses deux constituants (1), ou dans la fixation de l'enzyme au substrat (2), que s'exerce le rôle du métal.

Des hypothèses l'admettant ont été fondées sur l'observation suivante : les métaux qui interviennent le plus souvent dans ces réactions enzymatiques -Mn, Fe, Zn, Co, Ni, Mg- forment tous des complexes de coordination avec un grand nombre de corps, et, en particulier, avec des groupements fonctionnels azotés, sulfurés, ou hydroxylés de molécules organiques. Le co-enzyme pourrait être ainsi lié à l'apoenzyme ou le substrat à l'enzyme.

1) Données Expérimentales :

Il existe, en dehors du fait essentiel : activation de tous les enzymes étudiés par des ions métalliques, quelques faits expérimentaux sur le comportement de la protéine enzymatique ou du substrat en présence de métal.

a) Existence de liaisons enzyme-métal :

L'exemple le plus net est celui de la carboxylase. KUBOWITZ et LUTTGENS (130) d'une part, GREEN, HERBERT et SUBRAHMANYAN (73) d'autre part, ont étudié la composition de celle-ci et, bien que différant quantitativement, leurs résultats montrent que l'enzyme est constitué par une molécule protéique spécifique, un coenzyme (aneurine-diphosphate : 1 mol-gr pour 1 mol-gr de protéine) et du magnésium (1 à 5 atomes-grammes pour 1 mol-gr de protéine).

D'autres faits furent apportés par SMITH grâce à ses recherches sur les peptidases. JOHNSON (109) avait signalé que la plupart des peptidases étaient activées par des métaux, notion que de nombreux travaux de MASCHMANN (145) et les recherches de ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI et NGUYEN-VAN BAI (185) avaient permis d'étendre. SMITH montra d'abord que le métal n'agissait pas seulement comme activateur, mais qu'il paraissait lié chimiquement à la protéine enzymatique (209) : il existe en effet une réaction d'équilibre entre le métal et la protéine car, si l'on met simultanément en présence l'enzyme, le métal, et le substrat, l'hydrolyse, d'abord lente, voit sa vitesse s'accroître rapide-

ment; si, au contraire, on fait incuber l'enzyme et le métal préalablement à l'addition de substrat, l'hydrolyse présente immédiatement une vitesse demeurant invariable par la suite. La formation de la combinaison EM semble suivre la loi d'action de masse d'un complexe dissociable, car la courbe d'action du mannogénèse sur la leucine-aminopeptidase se confond avec la courbe théorique d'un équilibre dans lequel un atome de Mn se combinerait à un groupement actif de l'enzyme (204).

Plus récemment⁽¹⁾, MALMSTROM, étudiant l'action des ions Mn sur l'énolase, découvrit (141) un parallélisme très net entre l'activation de l'enzyme et la fixation sur lui d'ions métalliques.

b) Existence de liaisons substrat-métal :

Des preuves certaines en furent données par SMITH, avec l'étude de l'action de la glycyglycine-dipeptidase (205) (206), processus activé par l'addition d'ions cobalt. Si l'on suit au spectrophotomètre l'effet de l'addition de substrat (S = glycyglycine) à une solution de cobalt, on constate que le spectre de celle-ci est alors profondément modifié, indiquant la formation d'un complexe défini entre S et Co. En étendant son étude à d'autres substrats, SMITH trouva un parallélisme remarquable entre leur aptitude à former un complexe avec Co et leur susceptibilité à être hydrolysés par la glycyglycine-dipeptidase (ainsi pour la sarcosylglycine on observe également la formation d'un complexe et l'hydrolyse, alors que les deux propriétés font défaut pour la diméthylglycyglycine ou la glycylysarcosine).

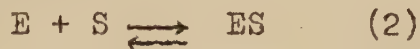
Un grand nombre d'autres exemples de complexes métal-substrat ont été identifiés : c'est le cas de l'arginine - HELLMAN (94) -, des acides β -cétoniques-KORNBERG (126)-, et d'un grand nombre d'acides organiques ou aminés-CANNAN (29), GREENWALD

(1) Les résultats de MALMSTROM sur l'énolase parurent en Février 1953, juste après que nous ayons nous-mêmes terminé notre étude sur la liaison arginase-métal par des conclusions tout à-fait semblables aux siennes.

(82)(83), NEUBERG (164).

2) Hypothèses faites sur le Rôle du Métal dans l'activité de l'enzyme :

MICHAELIS et MENTEN (152) ont, les premiers, relié l'activité enzymatique à la formation d'une combinaison entre l'enzyme et le substrat. Leur hypothèse est aujourd'hui universellement admise et a reçu récemment une confirmation expérimentale par les travaux de KEILIN et MANN (112) et surtout de CHANCE, qui a rassemblé un grand nombre de preuves physiques de l'existence de ce composé intermédiaire ES (30). L'existence de celui-ci étant générale, on doit envisager comment les liaisons dont nous avons parlé ci-dessus peuvent favoriser sa formation. Elles suggèrent que la réaction :



peut se décomposer en $E + M \rightleftharpoons EM \quad (4)$



ou bien en $S + M \rightleftharpoons MS \quad (5)$



Dans un cas (4) l'enzyme actif serait une métalloprotéine, dans l'autre (5) l'enzyme agirait sur un complexe métallique du substrat. Nous commencerons par étudier cette hypothèse, la plus simple.

a) Hypothèse du complexe métallique du Substrat :

Cette hypothèse, due à NAJJAR (163), s'appuie sur les derniers faits expérimentaux cités. Elle néglige les premiers (liaison enzyme-métal) car la plupart d'entre eux reposent sur l'emploi de préparations enzymatiques très impures. Mais surtout, si l'enzyme peut former un complexe métallique à sa surface active, on devrait pouvoir saturer tous les points d'attache possibles à l'aide d'une préincubation avec le métal; si l'on exposait alors le complexe ME au complexe MS beaucoup plus dissociable, la vitesse d'hydrolyse serait régie par la vitesse

de dissociation de ME : la vitesse d'hydrolyse serait donc plus lente que si l'enzyme seul était mis en présence du complexe MS. Estimant que ceci est contraire aux résultats expérimentaux acquis, NAJJAR aboutit à l'hypothèse suivante : le métal n'aurait pas à s'unir à l'enzyme de façon spécifique et ne fonctionnerait pas seul pour labiliser la liaison à rompre comme dans le cas exceptionnel de l'oxaloacétate - KRAMPITZ (128). Ce qui rendrait le métal indispensable c'est son pouvoir de former le complexe de coordination qui est le véritable substrat de l'enzyme : les véritables substrats de l'arginase, des amino- et carboxy-peptidases seraient les complexes métalliques de l'arginine, des peptides. Peut-être le métal modifie-t-il ainsi le moment du dipole électrique de la molécule, de façon à accroître l'affinité de celle-ci pour l'enzyme. Peut-être amène-t-il les groupements polaires du substrat à prendre une configuration spatiale telle qu'ils se placent près des orbites d'attraction des groupements de l'enzyme qui doivent les recevoir. Pareil rôle serait compatible avec l'interchangeabilité du métal (à condition que les caractéristiques atomiques : charge et rayon ionique, potentiel, mobilité... restent proches).

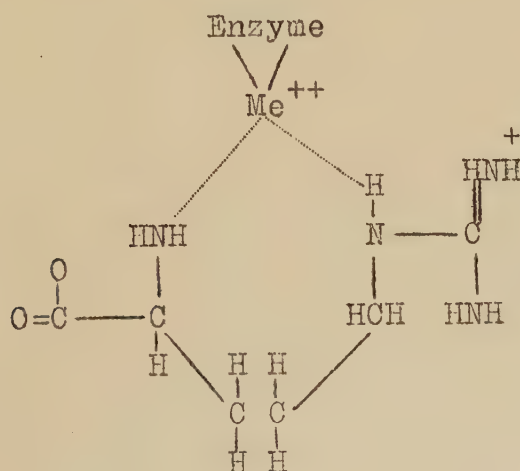
NAJJAR ajoute un argument d'ordre physiologique : les acides aminés forment avec la plupart des métaux divalents des complexes chélatés (composés cycliques à cinq membres) très peu dissociés -TOPP (227) -. La plupart de ces molécules organiques ne peuvent exister à l'état libre en présence de métaux; de tels substrats existent donc très probablement dans les milieux biologiques sous forme de complexes chélatés solubles et sont ainsi transportés vers leurs enzymes respectifs. Si l'enzyme donné est dans une phase d'évolution adaptative avant sa fixation génétique, le seul substrat dont il disposait et pouvait disposer était ce complexe chélaté : en conséquence il ne peut agir que sur ce substrat.

Cette hypothèse rend bien compte du parallélisme observé par SMITH entre la susceptibilité d'un corps à l'hydrolyse

et son pouvoir de former des complexes avec les métaux activateurs de l'enzyme. Elle semble acceptable dans tous les cas où un complexe entre le métal et le substrat a été identifié. Un exemple assez favorable est celui des acides β -cétoniques : certains sont susceptibles de former avec des ions métalliques des complexes instables favorisant leur décarboxylation -KORNBERG (126)-; dans d'autres cas, le complexe formé est stable et l'addition de protéine spécifique est nécessaire pour provoquer la décarboxylation. Le rôle de la protéine serait alors de catalyser la formation du complexe substrat-métal et de le rendre instable par déformation électronique.

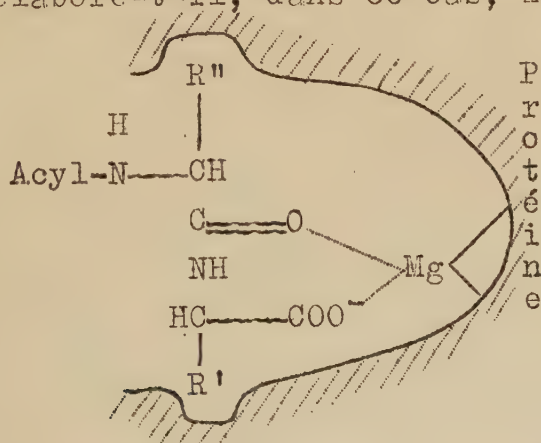
b) Hypothèse de la métallo-protéine enzymatique :

HELLERMAN émit la première cette hypothèse : (87)(91). Ayant constaté l'activation de l'arginase par Co^{++} , Ni^{++} , Mn^{++} , elle pensa que celle-ci était due au fait que l'un ou l'autre ion pouvait remplacer le constituant métallique de l'enzyme lorsque celui-ci en a été éliminé, au moyen d'un processus qui n'a pas modifié le reste de la molécule. Cette réactivation par substitution sembla être en rapport avec la propriété de ces ions de former des complexes de coordination. Elle en conçut l'hypothèse suivant laquelle l'enzyme et le substrat contribueraient tous deux, par ceux de leurs groupements qui conviendraient, à la formation d'un même complexe, conformément au schéma :



Cette coordination par le métal s'accompagnerait d'un remaniement des liaisons dans le groupement guanidique d'où résulterait une accélération de l'hydrolyse, avec formation d'ornithine et d'urée et régénération concomitante de l'enzyme-métal.

SMITH, le premier, apporta des faits à l'appui de ce qui n'était chez HELLERMAN qu'une hypothèse : il montra, nous l'avons vu, que le métal se fixait sur l'enzyme et, s'appuyant sur le fait que le métal seul est capable de se lier au substrat, supposa que fixé à la protéine le métal gardait encore son pouvoir, formant ainsi un lien entre l'enzyme et le substrat. Car si le métal se fixe bien sur le substrat, là n'est pas toute l'explication de l'action du métal : dans le cas de la glycylglycine-dipeptidase que nous avons cité, la glycylglycinamide qui forme un complexe avec le cobalt, n'est pas hydrolysée : c'est ici qu'apparaît le rôle de la protéine (207) (211). Mais c'est dans l'étude de la carboxy-peptidase que SMITH trouva la meilleure justification de son hypothèse. Dans le cas de cet enzyme, il semble que le métal (Mg) soit fixé au substrat par deux liaisons : l'une sur le groupement carbonyle de la liaison peptidique, l'autre sur le groupement carboxyle libre. Or la carbobenzoxylglycylglycine se révèle être un substrat très médiocre, alors que la carbobenzoxylglycylphenylalanine en est un excellent -HOFMANN et BERGMANN (98) -. C'est là d'après SMITH la preuve que la protéine fixe très fortement le groupement phényle terminal. Aussi élabore-t-il, dans ce cas, le schéma suivant :



Lorsque le peptide est ainsi lié à l'ion métallique d'une part, à la protéine d'autre part, la liaison peptidique est engagée

dans le cycle du complexe car les groupements polaires qui se lient au métal sont de part et d'autre de cette liaison : (208). L'action du métal se traduit alors par un réarrangement électronique de la liaison peptidique, grâce auquel l'énergie libre d'activation est assez affaiblie pour permettre la réaction. Le rôle de la protéine semble être d'intensifier cet effet électro-nique du métal.

Cette théorie se justifie également par l'explication qu'elle donne des phénomènes d'inhibition et de spécificité optique de l'enzyme. L'étude de l'inhibition de la carboxypeptidase montre que pour chaque centre actif de l'enzyme, il y a combinaison avec un ion orthophosphate, un ion sulfure ou deux ions cyanures (210). Comme le métal, Mg^{++} , peut former quatre liaisons (deux de coordination, deux de covalence), deux valences seraient bloquées par la combinaison avec l'inhibiteur, et deux probablement liées à la protéine. L'enzyme contenant apparemment des groupements SH actifs (forte inhibition par l'iodoacétate ou Cu), on peut penser qu'en l'absence de substrat ou d'inhibiteur, deux valences de Mg^{++} sont solidement liées à des groupements inconnus de la protéine et deux autres, de façon beaucoup plus lâche, aux groupements SH. En présence d'un ion inhibiteur de grande affinité pour le métal, les deux liaisons lâches se portent, réversiblement, sur celui-ci. En présence d'un substrat convenable, les combinaisons lâches avec la protéine seraient déplacées par le substrat, pour lequel le métal doit avoir une beaucoup plus grande affinité. Cette hypothèse est voisine de l'interprétation de la structure de l'hémoglobine dans laquelle, sur les six liaisons du fer, quatre sont coordonnées aux atomes N des noyaux pyrroliques, une est fortement liée à l'atome N du groupement imidazole et la dernière est liée de façon lâche à ce même groupement. C'est cette dernière liaison qui serait déplacée par O ou CO dans leur fixation sur l'hémoglobine : CORYELL et PAULING (36), WYMAN (251).

L'étude de la spécificité optique montre que les pep-

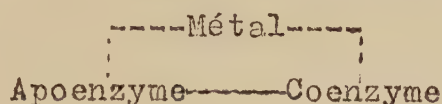
tides dont les groupements R' ou R" sont des acides aminés D ne sont pas hydrolysés -STAHMANN (214)- : ils ne peuvent en effet s'engager dans la structure de la protéine de façon à être liés en même temps au métal et aux deux positions de chaînes latérales. De même a-t-on ainsi l'explication du fait que les acides aminés L ne sont pas inhibiteurs, contrairement aux acides D -HOFMANN (98)- : c'est que les quatre centres d'attraction connus de l'enzyme (les deux liaisons avec le métal et les deux centres actifs qui agissent sur R' et R") ont une configuration spatiale fixe. Engagés dans la position pour chaîne latérale, les acides aminés L sont orientés, de telle façon que leur groupement carboxyle est présenté au métal, ce qui rend impossible la formation du complexe. Les acides D, au contraire, présenteront au métal leur groupement aminé, donc pourront participer à la formation d'un complexe.

3) Hypothèses faites sur le Rôle du Métal dans la Structure de l'enzyme :

La carboxylase, nous l'avons vu, est constituée par une molécule protéique, un coenzyme organique, et du magnésium. GREEN, HERBERT et SUBRAHMANYAN (74) réussirent à la dissocier et montrèrent que son activité peut être restaurée si l'on ajoute à un mélange d'apoenzyme et de coenzyme, Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , ou, à un degré moindre, Ca^{++} , Fe^{++} , Cd^{++} , ou Zn^{++} . Le métal jouerait ainsi un rôle non spécifique de "pont chimique" ou de "ciment" entre l'apoenzyme et le coenzyme. L'activité enzymatique ne lui serait alors liée qu'indirectement, ce que confirment, d'autre part, les travaux de WEIL-MALHERBE (242) suggérant que le groupement actif de l'enzyme est le radical $-NH_2$ en position 6 du cycle pyrimidinique de l'aneurine.

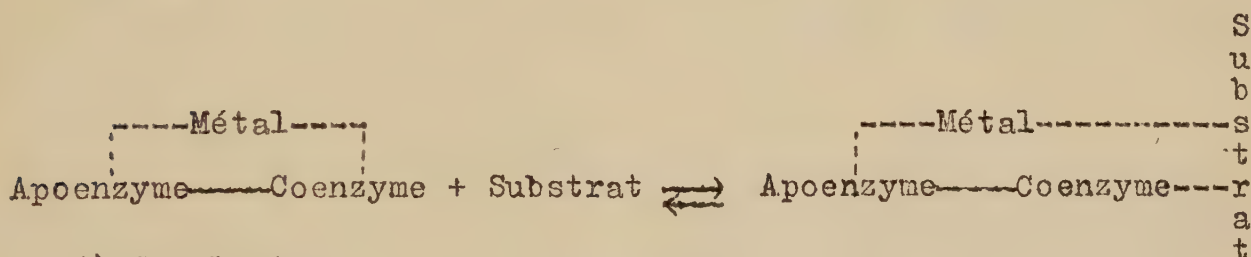
Pour tous les autres enzymes étudiés, la fraction de la molécule portant le groupement actif est beaucoup plus fortement combinée à l'apoenzyme que dans la carboxylase. Le métal s'ionise en effet, sans dislocation de la molécule, puisqu'une simple addition de cation réactive l'enzyme. De nombreux auteurs

ont pensé que le métal jouait le rôle de coenzyme. Mais ROCHE (177), se fondant sur le manque de spécificité du métal, envisage plutôt une participation du métal à la fixation de l'apoenzyme et du coenzyme. Il existerait, selon lui, entre ces deux corps deux liaisons distinctes : une très stable (par valence primaire——), une labile (par valence secondaire ---) dans laquelle le métal serait un intermédiaire, selon le schéma :



Le coenzyme, porteur du groupement actif, serait alors indissociable, comme par exemple lorsqu'il est constitué par une région d'une molécule protéique.

Cette hypothèse a trouvé une justification dans la représentation que SMITH a donnée de la carboxypeptidase et peut être combinée à celle de SMITH et de HELLERMAN pour donner le schéma :



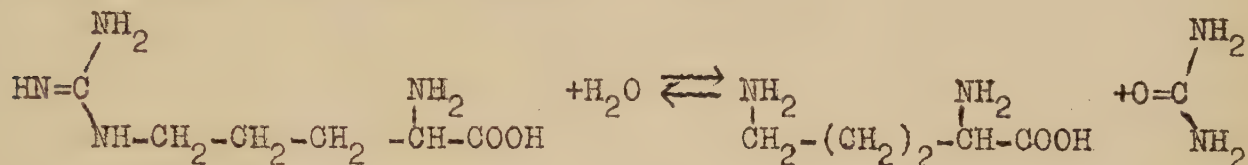
4) Conclusion :

Deux hypothèses s'offrent à nous : partant de la participation d'ions métalliques à l'activité enzymatique, SMITH et NAJJAR envisagent la formation d'un complexe à trois constituants : l'enzyme, le métal et le substrat. Mais le premier pense que le métal se fixe sur la molécule protéique, de façon à faciliter l'attraction de la molécule de substrat, tandis que l'autre suggère plutôt que la combinaison du métal au substrat favorise sa fixation sur l'enzyme. Les deux hypothèses sont apparemment satisfaisantes, mais celle de NAJJAR ne suffit pas à rendre compte de tous les faits. Il est bon, enfin, de noter que les seuls faits absolument démontrés sont l'existence de complexes métalliques du substrat en l'absence de protéine et celle de complexes métalliques de la protéine en l'absence de substrat.

- OBJET DU TRAVAIL -

Nous nous sommes proposé de soumettre ces théories à un contrôle expérimental par des recherches sur l'arginase. Les connaissances actuelles sur le mécanisme d'action et d'activation de cet enzyme peuvent être résumées ainsi.

L'arginase, dont l'existence dans le foie des mammifères, pressentie par RICHET (176), fut démontrée par KOSSEL et DAKIN (127), hydrolyse spécifiquement l'arginine avec formation d'ornithine et d'urée suivant la réaction :



Son importance est due au rôle qu'elle joue dans la transformation de l'azote aminé en urée lors du catabolisme des acides aminés : KREBS et HENSELEIT (129). Bien qu'elle ait fait l'objet de nombreuses recherches les résultats obtenus sont parfois contradictoires.

1) Activation de l'enzyme :

Son activation fut d'abord attribuée spécifiquement aux composés sulfhydryles par SALASKIN (193) (194) et WALDSCHMIDT-LEITZ (232). EDLBACHER (47) et KLEIN (114) montrèrent néanmoins que l'action des thiols n'était pas absolue et qu'elle dépendait de la pureté de l'enzyme et du pH.

WALDSCHMIDT-LEITZ (233) découvrit alors que l'action combinée des composés -SH et de métaux lourds tels que le fer et le cuivre activait l'enzyme et suggéra (234) que l'enzyme actif ne serait que la forme oxydée de l'arginase.

PURR et WEIL (171) ayant démontré l'activation par un mélange de fer et d'alloxane ou d'ascorbate, pensèrent même que la réaction d'hydrolyse exige un potentiel d'oxydo-réduction parfaitement défini.

Tout au contraire, LEUTHARDT et KOLLER (134) trouvèrent que les activateurs étaient des réducteurs, agissant par

protection de l'enzyme contre l'oxygène et les oxydants. Cependant HELLERMAN et PERKINS (91), étudiant l'action de composés mercuriels comme C_6H_5HgOH ou de réducteurs puissants (cystéine, bisulfite, cyanure, H_2S) qu'ils avaient déjà employés avec succès sur l'uréase (92) et sur la papaïne (90), les trouvèrent sans action notable sur l'arginase.

WEIL (241) confirma alors l'action activatrice du couple Fer-cystéine. C'est à HELLERMAN et PERKINS (91) que l'on doit la première constatation d'activation par de multiples ions métalliques. KLEIN (115) montra ensuite que le manganèse était indispensable à l'activité maximum de l'enzyme. L'activation par Mn, Co, Ni, Fe fut alors confirmée par KOCHOLATY (123), par TAKI (218), par HUNTER et DOWNS (106) et enfin par MOHAMED et GREENBERG (161). Bien que mise en doute par BACH (10), elle semble définitivement confirmée aujourd'hui après les travaux de MOHAMED (160). Il faut d'ailleurs signaler qu'elle a été de même démontrée sur un enzyme en provenance de farine de fève Jacques-STOCK (216), ANDERSON (3), et KONDO (125).

2) Constitution de l'enzyme :

Constatant l'effet des ions métalliques sur l'arginase, HELLERMAN et PERKINS conclurent que l'enzyme était un complexe métalloprotéique dont le métal peut être facilement dissocié et HELLERMAN (87) suggéra même que l'activation était due à la formation d'un complexe enzyme-métal-substrat. Pour EDLBACHER (50), au contraire, l'élément catalytique était le métal dont la protéine ne serait que l'entraîneur. Il abandonna d'ailleurs cette idée pour penser, comme HELLERMAN, que l'arginase serait une protéine conjuguée dont le groupement prosthétique serait le manganèse (48).

ROSSI (189) rejeta le manganèse comme constituant de l'enzyme; il montra d'ailleurs (191) que l'activation n'était le fait que de l'ensemble manganèse + coenzyme, coenzyme qu'il parvint à séparer de l'apoenzyme (190). MOHAMED et GREENBERG (161) pensèrent que la réaction d'activation pouvait se traduire par

l'existence d'un équilibre entre une proarginase inactive et dépourvue de métal et l'enzyme métallique actif. THOMPSON (226), lui aussi, aurait isolé un coenzyme.

Quant à MOHAMED (160), il conclut à l'existence de deux enzymes : l'un activé par Co^{++} et Ni^{++} , inhibé par Mn^{++} , l'autre activé par Mn^{++} et inhibé par Co^{++} et Ni^{++} .

3) Inhibition de l'enzyme :

L'arginase purifiée est stable, peu sensible à l'action de la chaleur, des métaux lourds (sauf l'argent et le mercure), et à celle de l'urée. Elle est, au contraire, sensible à l'action des ions fluore-LENTI (133) - ou borate - MOHAMED (159) - qui vraisemblablement bloquent le métal. Elle serait inhibée également par l'iode, la quinone, l'hydrogène sulfuré - HELLERMAN et PERKINS (91).

Mais les résultats les plus intéressants à ce sujet sont ceux de KITAGAWA (113) et surtout de HUNTER et DOWNS (107), qui ont montré que les acides aminés naturels inhibent l'arginase, vraisemblablement par formation d'un complexe arginase-acide aminé.

4) Conclusion :

La seule hypothèse qui ait été faite au sujet du mécanisme d'action de l'enzyme est celle de HELLERMAN que nous avons exposée précédemment et qui suppose la formation d'un complexe de coordination entre la protéine et le substrat autour du métal. Notre but a été d'apporter à l'appui de cette hypothèse des faits indiquant clairement l'existence d'un complexe enzyme-métal en l'absence de substrat, et celle d'un autre à trois éléments : enzyme, métal, substrat, lors de l'addition de substrat.

PLAN des RECHERCHES

Une première partie sera consacrée à des essais de purification de l'enzyme.

Dans une seconde partie nous reprendrons systématiquement l'étude de l'activation de l'arginase par des ions métalliques. Nous essaierons ensuite de montrer que le métal activateur se fixe sur la partie protéique de l'enzyme et que l'activation est bien liée à cette fixation. Ayant ainsi établi l'existence du complexe E-M, nous étudierons son comportement en présence d'arginine et essaierons de prouver qu'il donne naissance au complexe EMS.

Nous montrerons que les inhibitions concurrentes de l'enzyme et sa spécificité peuvent être interprétées de la même manière, ce qui nous permettra de déterminer les groupements du substrat qui sont intéressés dans la fixation au métal.

Dans une troisième partie nous essaierons de bloquer certains groupements libres de la molécule d'apoenzyme et de déterminer ainsi ceux qui interviennent dans la fixation du substrat ou dans son hydrolyse.

P R E M I E R E P A R T I E

PURIFICATION de l'ARGINASE

I - MÉTHODES D'ESSAI - DÉFINITION D'UNE UNITÉ ARGINASIQUE -

A/- Choix des méthodes :

La plupart des chercheurs qui ont étudié l'arginase ont utilisé pour le contrôle de l'activité arginasique la détermination de l'urée formée au cours de la réaction. Travaillant sur des préparations purifiées, ne dégradant donc l'arginine que par un processus arginasique, nous avons pu avoir recours à une méthode plus directe : l'étude de la disparition d'arginine au cours de la réaction.

Nous avons utilisé pour cela la réaction découverte par SAKAGUCHI (192) et fondée sur la coloration rose qui prend naissance, dans une solution d'arginine, par action d'un hypochlorite ou hypobromite alcalin, en présence d' α -naphtol. Cette réaction appliquée selon la technique de WEBER (240) - nous en avons utilisé la variante mise au point par DUMAZERT et POGGI(43) - est très satisfaisante au point de vue quantitatif : si l'on se tient dans une marge de concentration comprise entre 10 γ /ml et 80 γ /ml, les erreurs de dosage ne dépassent pas 1%; nous avons utilisé pour les lectures le spectrophotomètre Beckman, à la longueur d'onde 510 m μ . Aucun des produits d'hydrolyse ou du milieu réactionnel n'interfère avec cette réaction; d'où l'emploi presque constant que nous en avons fait.

Cependant dans quelques cas, la présence dans le milieu réactionnel d'une substance susceptible de gêner la réaction de SAKAGUCHI (formaldéhyde) ou bien l'intérêt que nous avons à ce que l'hydrolyse ne concerne qu'une très faible fraction de l'arginine présente, nous ont amené à utiliser les dosages d'urée formée. Dans ces cas, nous avons employé la méthode d'ENGEL et ENGEL (53) : elle repose sur la précipitation de l'urée sous forme de dixanthylurée par le xanthidrol, la séparation du précipité, et la formation d'une coloration jaune par addition d'acide sulfurique à 50 %. On lit au spectro-photomètre à 420 mμ et on peut déterminer ainsi avec une excellente précision une quantité d'urée comprise entre 4 γ et 60 γ (ce qui correspond à l'hydrolyse de 12 γ à 174 γ d'arginine).

B/- Choix de la Concentration en Substrat :

Nous avons déterminé les concentrations en substrat pour lesquelles la quantité d'arginine détruite (ou d'urée formée) est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent.

VAN SLYKE a montré (229) la validité pour l'arginase de l'équation cinétique établie pour l'uréase par VAN SLYKE et CULLEN (231) :

$$E = \frac{I}{t} \left(\frac{I}{K_I} \log \frac{a}{a-x} + \frac{x}{K_2} \right)$$

si l'on désigne par E la concentration en enzyme,

a et a-x la concentration en substrat aux temps 0 et t et K_I et K_2 les constantes de vitesse de la combinaison E-S et de la décomposition de ES.

VAN SLYKE et ARCHIBALD (230) en déduisent que la présence d'une forte concentration en arginine fera dépendre la vitesse totale de la réaction presque uniquement de la vitesse de décomposition du composé E-S (celui-ci en effet se formera en un temps négligeable). Dans ce cas pour une réaction limitée dans le temps l'équation se simplifiera en :

$E = \frac{x}{K_2 + x}$, puisque a sera toujours très grand par rapport à x (donc $\log \frac{a}{a-x} \sim 0$)

La courbe (fig. N° I) de l'activité en fonction de la concentration initiale en substrat que nous avons déterminée sur

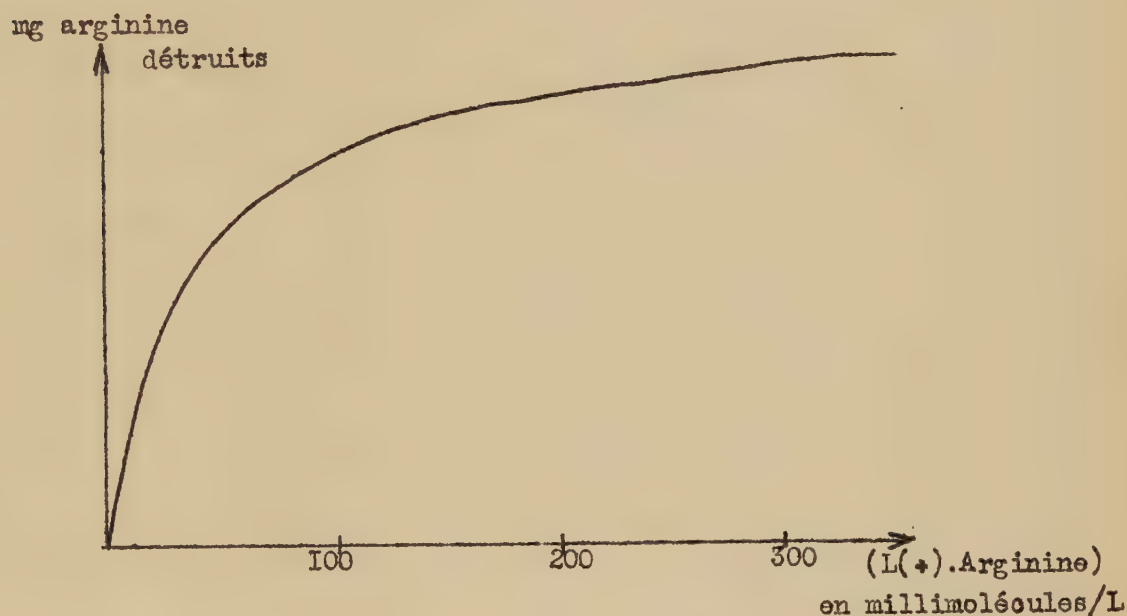


FIGURE I - Effet de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse de l'arginine par l'arginase à pH 9,5 et 25°.

nos préparations, concordant avec celle de VAN SLYKE, permet d'adopter la définition de l'unité arginasique proposée par cet auteur : "une unité d'activité arginasique est la quantité d'enzyme qui, à 25° et pH 9,5, avec une concentration initiale de substrat de 0,285 M, décompose, en une minute, une micromolécule d'argine".

C/- Pureté des Préparations :

Nous exprimerons donc ainsi l'activité de nos préparations et nous suivrons leur pureté en étudiant :

$$P = \frac{\text{nombre d'unités arginasiques par ml}}{\text{nombre de mg N protéique par ml}}$$

Nous déterminerons la teneur en protéine de nos préparations, soit par la méthode de Kjeldahl, soit pour des mesures relatives à un même stade de purification, par lecture de la densité optique de nos solutions au spectrophotomètre.

Des mesures faites parallèlement par ces deux méthodes ont permis de constater qu'aux dernières étapes de la purification une solution à pH 7 de 1 mg de protéine par cc (soit 160 γ N/cc) présente à 277 m μ , longueur d'onde d'absorption maximum, une densité optique de 1,2 pour une épaisseur de 1 cm.

D/- Techniques :

L'intérêt qu'il y a à suivre la réaction enzymatique dans toute la gamme des concentrations de substrat nous ont amené très souvent à travailler en présence de concentration en arginine de 0,017 M (ou autres, qui seront précisées ultérieurement); les mélanges réactionnels sont composés comme suit :

Cas standard - 2 ml d'une solution contenant 6,951 g d'arginine
8 g de pyrophosphate
de sodium pour 100 ml ($P_2O_7Na_4, 10 H_2O$)
et amenée à pH 9,5

- 0,8 ml d'une solution contenant l'enzyme et les effecteurs de la réaction (cations métalliques, inhibiteurs etc...)

Cas 0,017 M - 2 ml d'une solution contenant 8 g. de pyrophosphate
de sodium pour 100 ml
et amenée à pH 9,5

0,2 ml d'une solution d'arginine à 4,135 g pour 100ml
- 0,6 ml d'une solution de l'enzyme et des effecteurs.

Au temps 0 on ajoute à la solution du tampon et de l'arginine, la solution enzymatique; au temps voulu (en général 10 minutes) on arrêtera la réaction en ajoutant 0,8 ml d'une solution 3 M d'acétate de sodium à pH 4,4.

On remarquera que la solution tampon est toujours constituée par du pyrophosphate. L'emploi de ce tampon dont l'idée revient à BACH (10), présente les trois avantages suivants :

- bon pouvoir tampon vers pH 9
- en présence de pyrophosphate , le cobalt (également Ni) qui précipiterait à ce pH, est maintenu en solution par la formation d'un complexe, et demeure cependant susceptible de participer à la réaction enzymatique.

- Le cuivre, dont la présence à l'état de traces est si difficile à éliminer de l'eau (cependant nous n'utilisons que de l'eau "permutée", c'est-à-dire ayant passé à travers une colonne échangeuse de cations et une d'anions) est retenu sous forme de complexe stable par le pyrophosphate et ainsi ne peut participer à la réaction enzymatique⁽¹⁾.

Mais l'emploi de ce tampon doit être évité pour les solutions enzymatiques activées par du manganèse : le pyrophosphate les inhibe, en effet, partiellement⁽¹⁾. Nous le remplaçons alors par un tampon au véronal.

(1) Cette différence de comportement du cobalt, du cuivre et du manganèse, qui sera expliquée plus loin, provient uniquement du fait que :

affinité de Co pour enzyme	>	affinité de Co pour pyrophosphate
affinité de Cu pour enzyme	<	affinité de Cu pour pyrophosphate
affinité de Mn pour enzyme	~	affinité de Mn pour pyrophosphate

II - METHODES DE PURIFICATION -

A/- Méthodes existantes :

L'arginase est remarquablement stable jusqu'à 60° C et peut être précipitée de ses solutions par addition d'acétone ou de sulfate neutre d'ammonium. Ces trois propriétés ont servi de base aux premières préparations de RICHARDS et HELLERMAN (175), de HUNTER et DOWNS (106) et de MOHAMED et GREENBERG (161). Ces essais furent suivis récemment de recherches systématiques de purification :

- en 1946, BACH (10) pensa avoir cristallisé l'arginase;
- en 1948, THOMPSON (226) proposa une préparation longue et délicate qui fournirait au mieux un produit dont l'arginase constituerait 80 %;
- en 1949, MOHAMED (157) reprit le travail de BACH, nia l'obtention de cristaux et démontra que le produit final de BACH se composait de cinq constituants protéiques; il proposa, à son tour, une nouvelle préparation (158), qui donnerait, d'une part une arginase très active et homogène et, d'autre part, un produit à trois constituants dont l'arginase formerait 85 %; depuis il affirma avoir ainsi isolé deux arginases différentes (160);
- en 1951 enfin, GREENBERG, dans une étude d'ensemble sur l'arginase (76) signala une préparation qui donnerait un produit à trois constituants, dont l'arginase constituerait 90 %.

B/- Recherches personnelles :

La nature et le nombre des expériences que nous envisagions nous ont amené à rechercher, sinon l'obtention de l'enzyme pur, du moins une préparation simple et de bon rendement, donnant un produit final constant, riche en arginase et dépourvu de catalase (cet enzyme, dont la présence dans les préparations d'arginase hépatique a été signalée par MOHAMED et GREENBERG, colore en jaune brun les solutions : forte absorption vers 400mp).

1) Critique des anciennes méthodes :

La méthode de MOHAMED ne nous a permis d'obtenir que

des produits peu actifs; ceci tient aux conditions exceptionnellement rigoureuses de la méthode : longs séjours - 8 heures - répétés dans l'acétone; chauffage à 80° C; traitement par l'acétate de plomb à une très forte concentration (2 mg Pb/ml).

La méthode de THOMPSON est longue et délicate; son rendement est faible (très inférieur à celui annoncé) et la qualité du produit final est excessivement variable.

Nous n'avons enfin eu connaissance de la méthode de GREENBERG qu'au moment où nous possédions déjà une technique satisfaisante. C'est la méthode de BACH qui nous l'avait fournie : nous avons constaté en effet que, si les objections de MOHAMED quant à la valeur du produit final sont parfaitement fondées, le début de la préparation n'en constitue pas moins une excellente base de départ. Rappelons-le sommairement : extraction par l'eau à pH neutre de poudre acétonique de foie; élimination successive des protéines : précipitant par chauffage de 75 secondes à 51° C-pH 6,1 -, ne précipitant pas à 54,5 % d'acétone, précipitant à pH 6,3, précipitant par chauffage de 3 minutes à 54° C-pH 7,2 -, précipitant en présence de sels de zinc.

2) Modifications de la méthode de BACH :

La solution A obtenue après ce traitement était soumise par BACH à un fractionnement très délicat au sulfate d'ammonium, dont l'intérêt était d'obtenir une illusoire cristallisation et qui occasionnait une très forte perte d'activité. Il nous a semblé devoir être remplacé.

a) Fractionnement au sulfate d'ammonium :

La solution A est additionnée de chlorure de cobalt (concentration finale : $10^{-3}M$) et amenée à pH 7,2; on y ajoute lentement 13/7 de son volume d'une solution saturée de $SO_4(NH_4)_2$ amenée également à pH 7,2 (concentration finale en $SO_4(NH_4)_2$ correspondant à 65 % de la saturation). On laisse reposer de 24 à 48 heures; on centrifuge et le précipité est redissous dans très peu d'eau; le pH de la suspension est ajusté à 7,0

et l'on centrifuge : le précipité insoluble est éliminé et le filtrat gardé : solution B. On ajoute alors le volume de solution saturée de sulfate d'ammonium nécessaire à l'obtention de la concentration désirée (45, 50, 55 ou 60 %). On laisse en contact 3 heures et l'on centrifuge. En partant de parties aliquotes d'une même solution B, on peut ainsi préciser les activités des diverses fractions 0-45 %, 45-65 %, 50-65 %... d'où l'on déduit aisément celles des fractions 0-45 %, 45-50 %, 50-55 %...

TABLEAU I : Fractionnement au sulfate d'ammonium d'arginase hépatique

FRACTION	N total	ACTIVITE	PURETE	POURCENTAGE d'ACTIVITE
0-65 %	11 mg	6210 U.A.	565	100
0-45 %	2	360	180	5,8
45-50 %	4	260	65	4,1
50-55 %	2,2	2200	1000	35,3
55-60 %	1,3	2950	2220	47,5
60-65 %	1,5	450	300	7,2

Chiffres en : pourcentage de la saturation en sulfate d'ammonium, mg d'azote protéique, unités d'activité arginasique, unités de pureté.

En prenant la fraction 50-60 %, on conservera donc 83 % de l'activité totale tout en multipliant la pureté par 2,6.

b) Modification du traitement thermique :

Le deuxième chauffage de la méthode de BACH (3 minutes à 54° C) nous a paru pouvoir être remplacé avantageusement par un chauffage de 5 minutes à 60° C : le produit final comporte en effet 29 mg d'azote protéique, 32500 unités d'activité arginasique, soit une pureté de 1120 dans le premier cas, contre 20,6 mg N, 30100 U.A. soit une pureté de 1460 dans le second.

3) Fractionnement à l'alcool éthylique :

Nous nous sommes proposé d'étudier l'hétérogénéité protéique de la solution C obtenue par fractionnement au sulfate

d'ammonium entre 45 et 65 % de la saturation. Nous avons pour cela établi sa courbe de solubilité en présence d'alcool éthylique suivant la technique mise au point par ROCHE et DERRIEN (39) (180). Nous avons donc réalisé une gamme de mélanges hydro-alcooliques de teneur croissante en alcool (0, 30, 32 ... et de deux en deux jusqu'à 60, 70 %) dans lesquels nous avons, à froid, ajouté une quantité toujours égale de solution C, à pH 7,2. Nous avons laissé toute la nuit à -3°C , puis centrifugé. La teneur en protéine et l'activité du filtrat ont été ensuite déterminées normalement. Nous avons réuni dans la figure n° 2 la courbe de

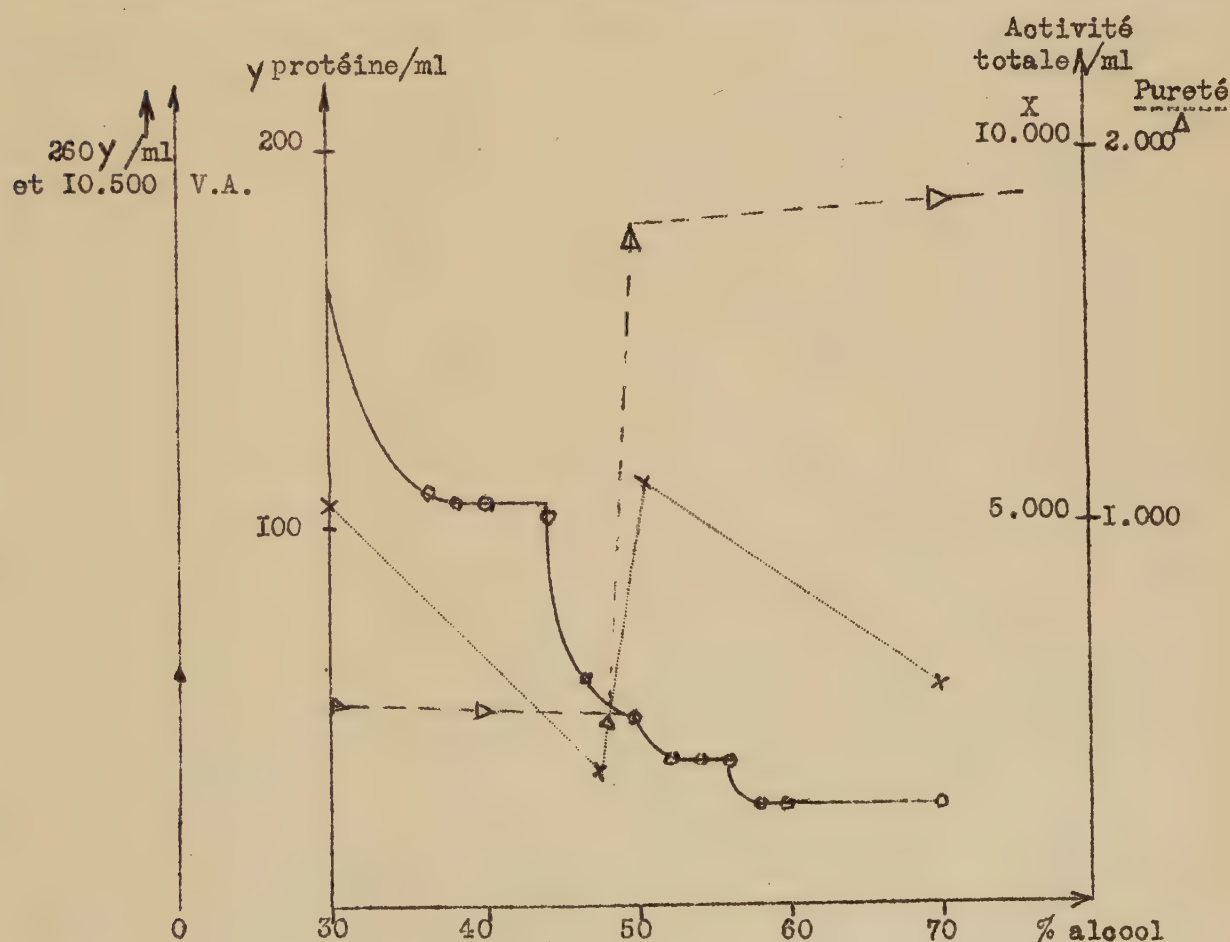


FIGURE 2 : Précipitation de la solution arginasique C par l'alcool à concentration croissante (pH 7,2; T = -3°C)

Abscisses : teneur des mélanges en alcool

Ordonnées : tracé continu : X N protéique/ml en solution
tracé discontinu : pureté du mélange protéique restant en solution

tracé pointillé : activité totale en solution

Concentration initiale en protéine : 162,5 γ N/ml

solubilité (mg N protéique/ml), la courbe de la pureté et celle de l'activité enzymatique totale du filtrat en fonction de la concentration en alcool.

L'examen de la figure montre que la solution initiale contenait au moins cinq fractions protéiques; que seules les fractions précipitant entre 50 et 70 % sont douées d'activité arginasique; et qu'au contraire la fraction précipitant entre 44 et 50 % inhibe l'arginase. Pour séparer l'arginase des protéines inactives, des essais de précipitation fractionnée ont été entrepris, mais ont montré que des phénomènes d'adsorption rendent très difficile la séparation. Deux méthodes ont été essayées pour l'améliorer :

- on dialyse la solution C 4 heures, en agitant, contre une solution de cobalt $5 \cdot 10^{-4} M$, jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium; on refroidit à $0^{\circ}C$ et on ajoute, goutte à goutte en agitant, un volume d'alcool. Le mélange est laissé toute la nuit à $-5^{\circ}C$, puis centrifugé; le précipité est mis en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium à 10 % de saturation, chargée en cobalt à $5 \cdot 10^{-4} M$: on rejette la partie insoluble; on a ainsi la solution 1. Le filtrat est repris par un demi volume d'acétone (cette quantité suffit pour rassembler toutes les protéines restant en solution); le précipité est traité comme le précédent : solution 2;
- on dialyse C dans les mêmes conditions pour la débarrasser de ses sels; on y dissout du chlorure de sodium jusqu'à une concentration de 0,5 M; on opère ensuite le fractionnement comme ci-dessus.

Les résultats des deux méthodes sont réunis dans le tableau II.

L'adsorption de l'arginase sur les protéines inactives a bien eu lieu dans la première méthode, alors qu'elle a été évitée dans la seconde, mais si la première permet d'atteindre une pureté supérieure, la seconde garde entière l'activité totale.

Dans le second cas, on ajoute à deux parties de solution arginasique, une partie de suspension de gel, préparée de la façon décrite par KUNITZ, on agite quinze minutes, laisse reposer dix minutes puis centrifuge. Cette méthode a été essayée à différents pH.

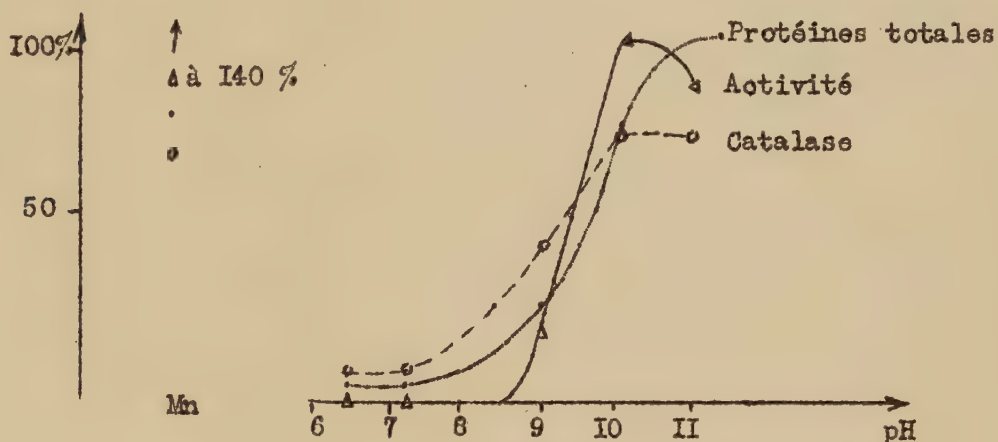


FIGURE 3 : Effet du pH sur des essais d'adsorption sélective sur phosphate tricalcique - Comparaison avec l'adsorption sur phosphate de manganèse.

Abscisses : pH auquel est faite l'adsorption

Ordonnées : tracé continu : pourcentage de l'activité restant en solution

tracé discontinu : pourcentage de catalase restant en solution

tracé pointillé : pourcentage de l'ensemble des protéines restant en solution

A gauche : pourcentages correspondants obtenus avec le phosphate de Mn.

Nous avons réuni sur la figure n° 3 l'ensemble de nos résultats, la quantité de catalase étant déterminée approximativement d'après la densité optique de la solution à 400 mp.

Dans l'adsorption sur phosphate de manganèse d'autres protéines que la catalase sont adsorbées : mais la pureté de la préparation n'est pratiquement pas modifiée, la forte augmentation d'activité n'étant due qu'à la présence du manganèse. La

méthode est, d'autre part, très délicate (une légère variation de pH entraîne un échec total).

L'adsorption sur phosphate tricalcique est utilisable à pH 10,4 (96 % de N total, 70 % de catalase seulement), car au-delà, s'il est vrai que la séparation est meilleure, l'arginase se dénature partiellement.

Ces méthodes, enfin, ne sont efficaces que sur des préparations riches en catalase et perdent, surtout la première, toute utilité à un stade avancé de la purification.

C/- Résultats des analyses électrophorétiques :

Quatre préparations différentes ont été étudiées :

- I : début BACH; fraction 45-65 % au sulfate d'ammonium; première méthode de précipitation à l'alcool.
- II : début BACH; fraction 45-65 % au sulfate d'ammonium; deuxième méthode de précipitation à l'alcool.
- III : début BACH; fraction 45-65 % au sulfate d'ammonium; on emploie successivement la première, puis la deuxième méthode de précipitation à l'alcool.
- IV : début BACH, mais avec chauffage de 5 minutes à 60°C); fraction 50-60 % au sulfate d'ammonium.

Les produits finaux de ces préparations ont été mis en solution à 1% dans un tampon au véronal de pH 8,6, de force ionique 0,2 et soumis à une analyse électrophorétique⁽¹⁾. Les résultats de celles-ci, et les caractéristiques d'activité et de pureté des produits correspondants ont été réunis dans le tableau n° III.

Six fractions protéiques apparaissent dans ces produits : la fraction B est la plus abondante. Comme sa mobilité (2,5 à pH 8,6) est compatible avec celles de la fraction b de MOHAMED (157), qui est également sa fraction la plus importante, on peut penser que la fraction B est la fraction douée d'activité arginasique. Comme MOHAMED (157) l'avait déjà signalé, cer-

(1) réalisée au centre d'électrophorèse du C.N.R.S.

TABLEAU III : Caractéristiques du produit final des diverses préparations d'arginase hépatique

		Préparations			
		I	II	III	IV
Proportion de la fraction	dont la mobilité est :				
A	1,2	9,5	0	8,6	7,2
(arginase ?)	2,5	38,4	26	60	58
C	3,6	43,6	18	17,1	34,8
(estérase ?)	4,1	0	16	0	0
E	5,1	8,5	13	14,2	0
F	7,5	0	27	0	0
Pureté du produit final		1.300	1.200	2.600	2.500
Rendement en activité totale		67%	80%	65%	80%
Mobilités en $\text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot 10^5$, à pH 8,6 (tampon véronal, $\mu = 0,2$)					
Préparations :		I BACH normale + première précipitation à l'alcool			
		II BACH " + deuxième " " "			
		III " " + première+deuxième " " "			
		IV BACH modifiée			

taines de nos préparations présentent une activité estérasique (essais sur le butyrate d'éthyle); MOHAMED a cristallisé cette estérase et indiqué (156) ses mobilités : 1,98 à pH 5,8; 2,98 à pH 7,0. On peut donc penser qu'elle constitue la fraction D.

D/- Conclusion :

Nous avons retenu comme préparation usuelle la préparation IV; son ensemble de résultats est en effet le plus satisfaisant; elle fournit un mélange protéique très constant et riche en arginase. Son exécution est aisée et, relativement, rapide. Notons d'ailleurs que BACH vient d'adopter dans une nouvelle note (11) deux modifications semblables aux nôtres.

Lorsque nous avons désiré une plus grande pureté, nous avons appliqué à notre solution enzymatique usuelle (IV) un fractionnement à l'alcool réalisé comme ci-dessus en deux étapes. Cette purification permet d'obtenir un produit de pureté 4.500 α . (ce qui correspond à un pourcentage d'arginase de 90 %). Nous n'avons pu analyser, comme les autres, ce produit, car la quantité de protéine nécessaire à une électrophorèse exige un travail de préparation très important, mais surtout en raison de la grande instabilité que présente l'enzyme à ce stade : il peut se dénaturer alors irréversiblement, soit au cours d'une dialyse, soit au cours de l'électrophorèse.

Nous rassemblerons, pour finir, le détail des opérations de purification.

1) Préparation usuelle :

- Extraction de 100 grammes de poudre acétonique de foie par deux litres de KOH N/500 à la température ordinaire, pendant 100 minutes : solution A.

- A est amenée à pH 6,1 et chauffée 75 secondes à 51°C, au bain-marie, puis refroidie brusquement; on centrifuge et porte le pH de la solution à 7,2 : solution B.

- B est traitée à froid par 1,2 volume d'acétone; le précipité est redissous dans 600 ml d'eau. On ajuste à pH 6,3 et laisse reposer à 3°C; un abondant précipité se forme et est écarté. On ajuste le pH de la solution à 7,2 et on la charge en sels de cobalt jusqu'à concentration finale $(Co) = 10^{-3}M$: solution C.

- C est chauffée pendant 5 minutes à 60° C, au bain-marie, avec une violente agitation. On refroidit brusquement et on écarte le précipité : solution D.

- On ajoute à D des cristaux de SO_4Zn , 7 H_2O en maintenant le pH de la solution à 7,5-7,8 jusqu'à une concentration finale $(Zn) = 2,6.10^{-3}M$. On élimine le précipité résultant et on ajoute à nouveau du cobalt en solution (la moitié de la quantité ajoutée précédemment). On ajuste à pH 7,2 : solution E.

- On ajoute à E 1,5 volume de solution saturée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ amenée à pH 7,2. On laisse reposer 24 heures à la température ordinaire et on recueille le précipité. On le dissout dans 100 ml d'eau et on ajuste le pH à 7,2 : solution F.

- On ajoute à F la quantité de solution saturée de sulfate d'ammonium nécessaire pour réaliser une concentration correspondant à 50 % de la saturation (tenir compte du fait que le précipité mis en solution était à 60 %). Laisser reposer 3 heures, écarter le précipité : solution G.

2) Préparation hautement purifiée :

- Dialyser G contre une solution de sels de cobalt, $(\text{Co}) = 5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, amenée à pH 7 jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium. Précipiter à froid par 1 volume d'alcool éthylique. Laisser reposer toute la nuit. Recueillir le précipité et l'éluer au moyen d'eau à pH 7,2 : solution H.

- Ajouter à H du chlorure de sodium jusqu'à une concentration de 0,5 M. Précipiter à froid par 1 volume d'alcool éthylique; rejeter aussitôt le précipité et ajouter 1 volume d'acétone. Recueillir le précipité dans un tampon à pH 7,2 chargé en cobalt à $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$: produit final I.

TABLEAU IV : Caractéristiques des différents stades de la préparation

Solution	A	B	C	D	E	G	H	I
Pureté	12	22	55	220	500	2500	3500	4500
Rendement	100	98	97	88	86	80	55	50
Pureté exprimée en Unités de Pureté								
Rendement : pourcentage de l'activité initiale restant après ce stade.								

Notre méthode permet donc, avec une perte ne dépassant pas 50 %, de concentrer 375 fois la solution initiale et d'obtenir ainsi un produit dont l'arginase doit constituer 90 %.

DEUXIEME PARTIE

ROLE DU METAL DANS L'ACTIVITE DE L'ENZYME

Chapitre I

ACTION DES IONS MÉTALLIQUES DIVALENTS SUR L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME

De nombreux auteurs attribuent une fonction coenzymatique à des cations activateurs de l'arginase. Toutefois l'argumentation conférant un rôle spécifique à un métal en raison de son aptitude à activer des préparations enzymatiques ne présente pas une sécurité absolue, car l'intensité de l'effet exercé par les cations est fonction du degré de pureté de l'enzyme et son sens peut même s'inverser dans certaines conditions -NGUYEN-VAN THOAI (222)-. Il est en effet essentiel de travailler sur des préparations purifiées et de définir des conditions où l'inactivation et la réactivation sont complètes, et nous nous sommes proposé de le faire dans le cas de l'arginase.

Toutefois l'addition de cations à l'enzyme inactivé reconstitue bien celui-ci, en ce sens que l'ensemble (protéine plus cation) catalyse l'hydrolyse de l'arginine, mais il se peut que certaines propriétés de l'arginase soient alors modifiées, par exemple en raison de remaniements superficiels de la molécule protéique - comme l'a signalé HUENNEKENS (100) (101) dans le cas d'oxydases.

Nous avons entrepris de préciser les conditions d'inactivation totale et de réactivation totale de l'arginase par certains cations divalents et l'inhibition de l'enzyme par d'autres.

A - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1) Conditions d'inactivation :

L'inactivation totale de l'arginase peut se réaliser par dialyse contre de l'eau à des pH acides : si l'on dialyse (dialyse tournante, eau renouvelée toutes les heures) 10 ml de solution enzymatique contre un litre d'eau permutée de pH 4,8, et que l'on suive l'activité de la solution sur des prélèvements successifs, on constate que l'enzyme perd 70 % de son activité dans la première heure, 96 % en deux heures et 100 % en deux heures quinze minutes. A ce stade l'enzyme inactivé reste en solution et est susceptible de réactivation complète. Si l'on prolonge la dialyse (cinq heures par exemple) des changements irréversibles se produisent : l'enzyme ne peut alors être réactivé en raison de remaniements profonds de sa structure. Ceci est d'autant plus sensible que l'enzyme est plus purifié : au dernier stade de la purification, il précipite irréversiblement lors d'une dialyse de deux heures.

Si, au contraire, on maintient l'eau de dialyse à un pH légèrement alcalin ou à la neutralité, la dialyse peut être prolongée plusieurs jours sans changement notable d'activité.

2) Conditions de réactivation :

Nous avons fait varier successivement un des facteurs suivants : temps d'incubation, température, nature et concentration du métal, pH de la solution d'incubation, concentration en substrat.

a) Temps et Température d'incubation :

Une même solution d'arginase inactivée (ou apo-arginase) a été incubée en présence de chlorure de cobalt (concen-

b) Action des différents métaux à diverses concentrations:

Nous avons, par dialyse tournante d'une demi-heure, obtenu une arginase partiellement inactivée (après incubation de trois heures à 37° dans un tampon véronal de pH 8 elle n'a que 50 % de l'activité initiale. Cette préparation enzymatique a été incubée 3 heures à 37° à pH 8, en présence de concentrations diverses des métaux suivants Mn, Co, Ni, Fe, Mg, Be, Ca, Zn, Cd, Pb, à l'état de chlorure ou de sulfates. Les principaux résultats sont réunis dans la figure n° 6, sur laquelle ne figurent pas ceux obtenus avec Cd, sans action, Zn et Pb, également sans action et déterminant une précipitation rapide de l'enzyme.

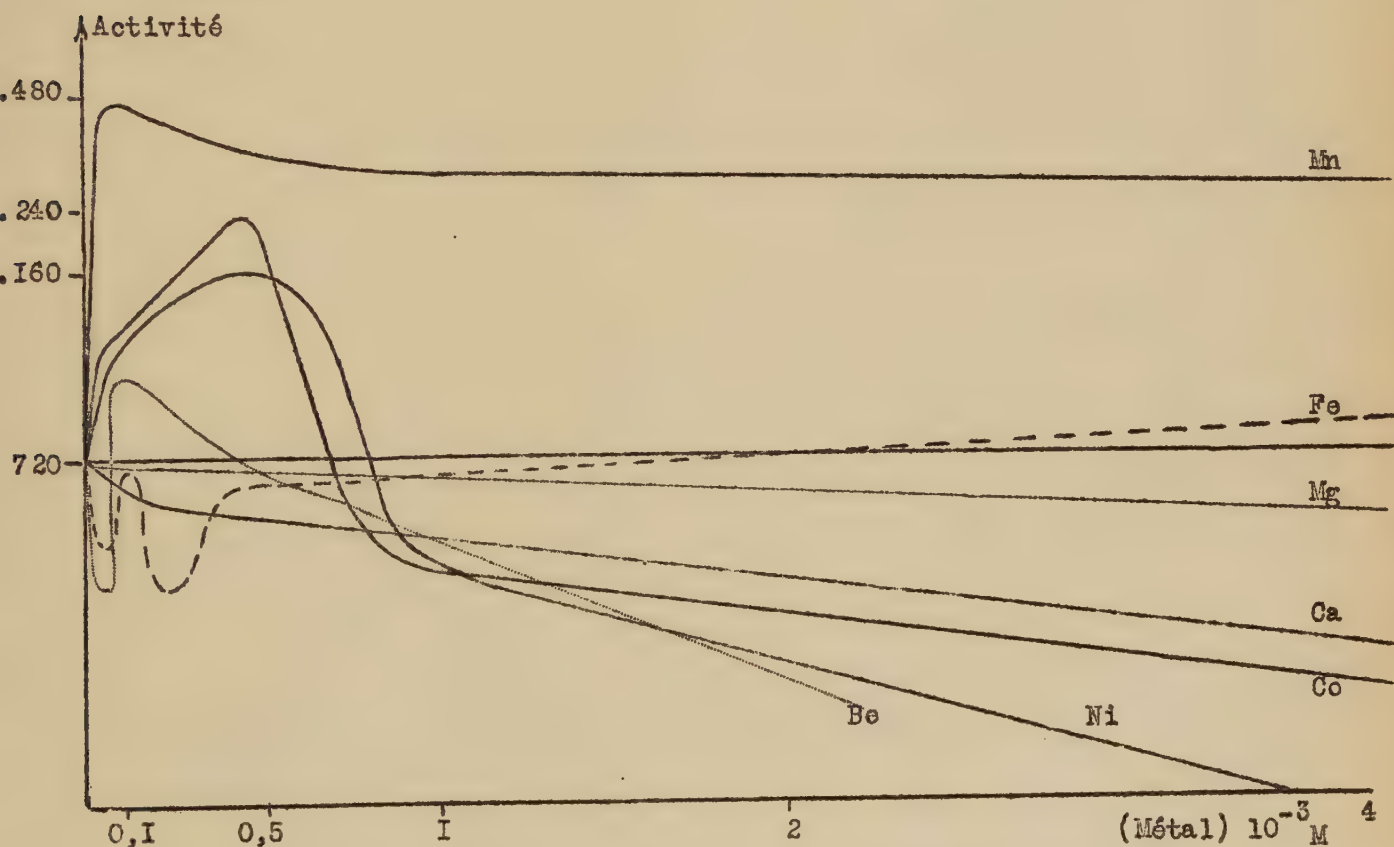


FIGURE 6 : Action de divers métaux sur l'arginase partiellement inactivée.

Abcisses : concentration en métal dans la solution d'incubation
 Ordonnées : activité obtenue après 3 heures d'incubation à 37°;
 l'activité a été déterminée en présence d'une concentration en substrat égale à $0,95 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

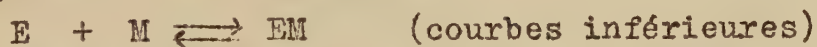
Il convient de noter que ces résultats diffèrent de ceux de MOHAMED et GREENBERG (161) par les points suivants :

- activation par Mn supérieure à l'activation par Co
- concentration optimum en Mn très inférieure à celle en Co
- possibilité d'inversion de l'action du cobalt.

c) Action du pH d'incubation :

Une même arginase totalement inactivée a été réincubée, dans les mêmes conditions de température (37°), de temps (4 h.), de concentration en cobalt et en manganèse, à des pH variant de 4,6 à 10,5. Après ces 4 heures d'incubation, l'activité était déterminée par une hydrolyse de 5 minutes à pH 9,5. A ce pH et dans ce temps très court, il ne semble pas que l'équilibre métal-protéine ait pu être même légèrement déplacé. Les courbes du bas de la figure 7 nous indiquent bien les variations de l'activité obtenue suivant le pH d'incubation. Nous avons fait figurer au-dessus les courbes d'activité de solutions arginasiques activées par Co ou Mn, en fonction du pH de la réaction d'hydrolyse.

La différence des pH optimum de réactivation par le cobalt (7,5) et par le manganèse (9,5) explique la différence des courbes d'activité en fonction du pH d'arginases activées par ces métaux - différence déjà signalée par HELLERMAN (93). La réaction totale (courbes supérieures) peut être en effet décomposée en deux réactions :



$EM + S \rightleftharpoons EMS$, qui fait intervenir l'affinité de l'enzyme pour le substrat, dont le maximum se situe vers 8,5 - GREENBERG (77).

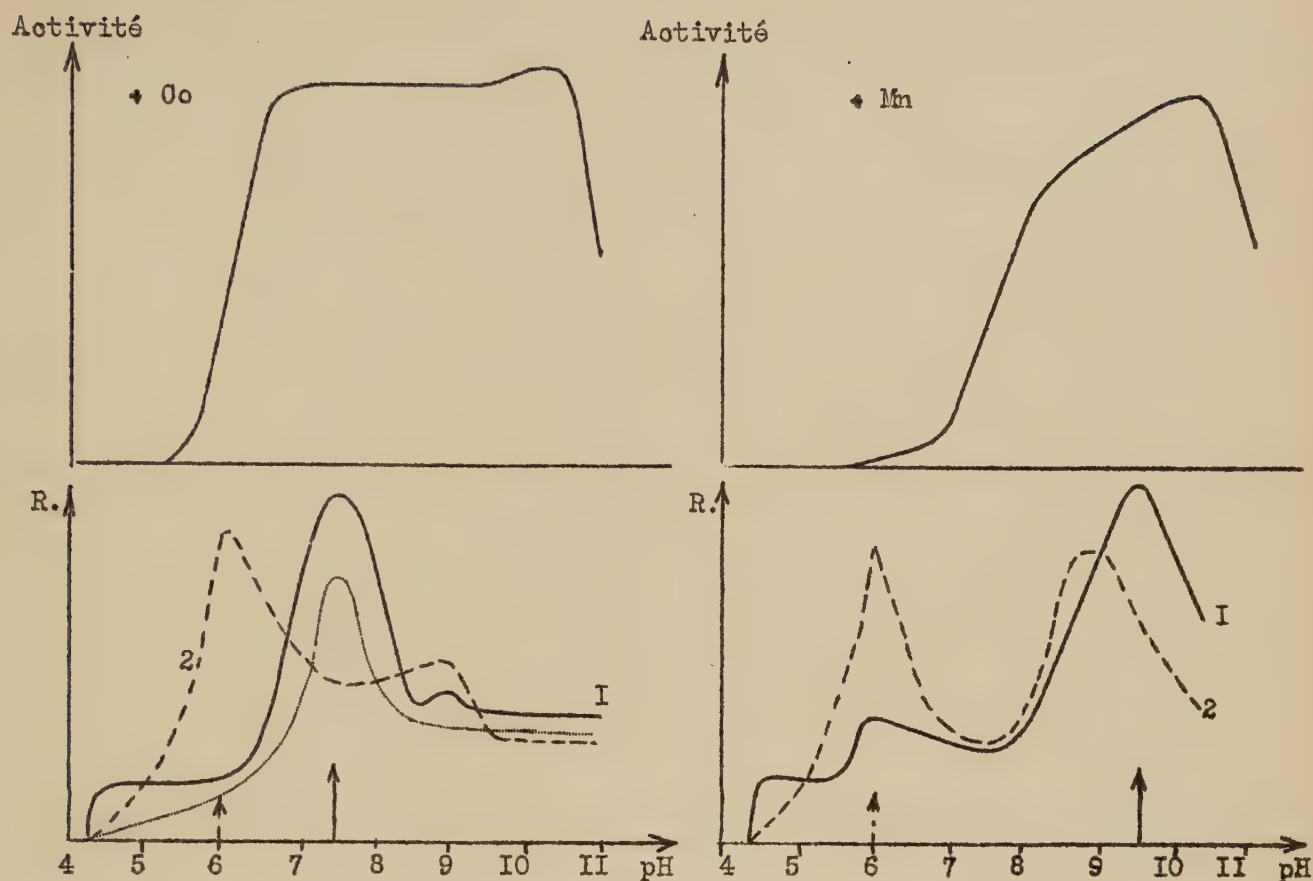


FIGURE 7 : Effet du pH sur la réactivation et sur l'activité de l'arginase.

scissées : pH courbe du bas : de la réactivation
" du haut : de l'hydrolyse

données : activité (toutes courbes)

gauche activation par Co	1 : M/600	à droite activation par Mn
	2 : M/300	1 : M/1200
	3 : M/60	2 : M/120

d) Effet de la concentration en Substrat :

Après avoir réactivé une solution enzymatique dans une solution de cobalt à pH 7,5, on l'a fait agir à pH 9,5 sur diverses quantités de substrat (concentrations allant de 0,0095 M à 0,285 M). On a ainsi déterminé la vitesse d'hydrolyse pour chaque concentration de substrat d'un enzyme réactivé à une concentration donnée de cobalt. L'expérience a été répétée en faisant varier la concentration de métal lors de la réactivation.

Les résultats, réunis sur la figure n° 8, confirment bien la différence d'action du cobalt de part et d'autre d'une concentration optimum.

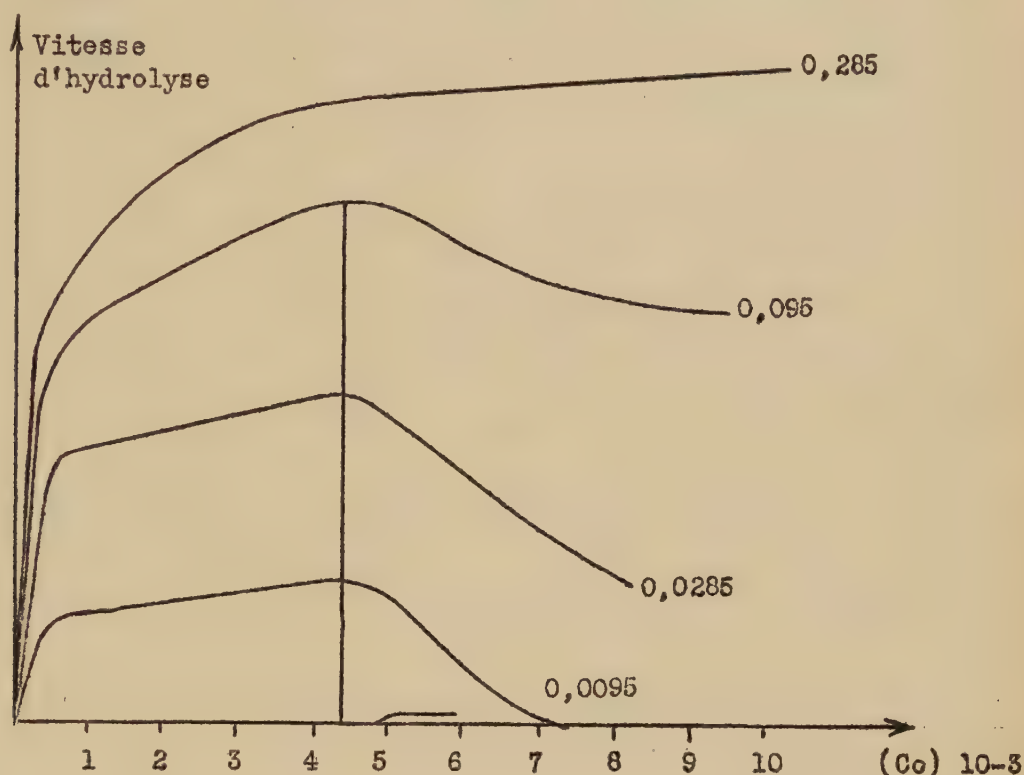


FIGURE 8 : Influence de la concentration en Substrat sur l'action activatrice du Cobalt sur l'Arginase.

Abscisses : concentration en cobalt.

Ordonnées : mg d'arginine détruits en 10 minutes

Les diverses courbes correspondent à des concentrations en substrat de 0,0095 M à 0,285 M.

Réactivation par incubation de 3 heures à 37°, à pH 7,5.

3) Inhibition par des métaux divalents :

Nous avons fait incuber une heure à 30°C, à pH 8, une solution arginasique douée de son activité maximum en présence de concentrations variables des trois métaux qui nous ont paru susceptibles de diminuer fortement l'activité de l'arginase : cuivre, calcium, béryllium. Nous avons ensuite déterminé l'activité de l'enzyme après incubation.

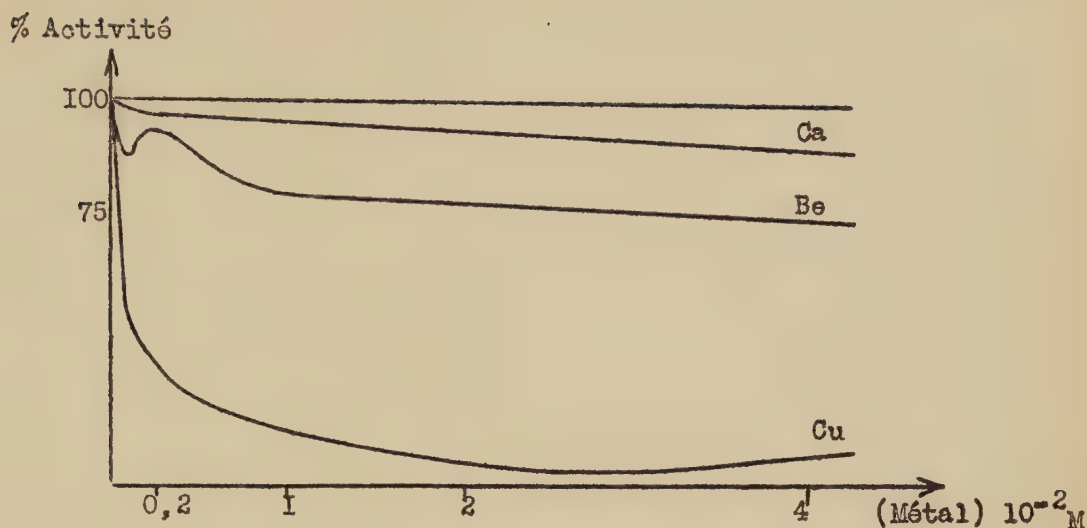


FIGURE 9 : Action de Cu, Ca, Be sur l'arginase
 Abscisses : concentration en métal de la solution d'incubation.
 Ordonnées : pourcentage de l'activité initiale restant après une heure d'incubation.

Seul le cuivre peut inhiber notablement l'enzyme lorsque celui-ci est dans son état d'activité maximum.

B - DISCUSSION DES RÉSULTATS

1) Métaux activateurs :

Trois métaux seulement semblent susceptibles d'activer notablement l'arginase. Ce sont le manganèse, le cobalt, le nickel. La concentration optimum en Mn est de $8,7 \cdot 10^{-4} M$ alors que pour le cobalt et le nickel elle se situe vers $4,4 \cdot 10^{-3} M$. Le pH optimum d'action des trois métaux est fort éloigné : 7,5 pour Co et Ni, 9,5 pour Mn. Les constantes de dissociation des complexes arginase-Mn et arginase-Co sont d'ailleurs différentes : nous les avons calculées à partir des courbes donnant la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en métal en ne considérant ici que celles établies en présence d'un excès de substrat. Le calcul classique -WURMSER (250) - nous a donné :

$$\frac{(P)}{(P-Mn)} \frac{(Mn)}{(P-Mn)} = 4.10^{-5} M$$

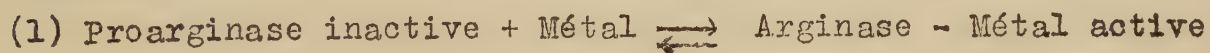
$$\frac{(P)}{(P-Co)} \frac{(Co)}{(P-Co)} = 3.10^{-4} M$$

Cette complexité de résultats se retrouve d'ailleurs dans l'action d'un même métal : pour le cobalt (et le nickel), la concentration optimum est le seuil d'une inversion de l'action du métal : à de plus fortes concentrations celui-ci devient en effet moins activateur puis inhibiteur. Ce phénomène ne semble pas être spécialement caractéristique de l'arginase : il a déjà été signalé par WARBURG et CHRISTIAN (236) et MALMSTROM (141) pour l'action de Mn et Zn sur l'énolase, par MASCHMANN (144) pour l'action de Zn sur les peptidases et par NGUYEN-VAN THOAI, ROCHE et ROGER (223) pour l'action de Fe et de divers métaux sur la phosphomonoestérase alcaline.

Mais aucun de ces auteurs ne semble avoir constaté que cette différence d'action est fonction de la concentration en substrat employée; en présence d'un fort excès d'arginine, Co redevient en effet un activateur de l'arginase, quelle que soit sa concentration; il n'existe plus de valeur optimum de la concentration en cobalt.

2) Mécanisme général de l'activation et de l'inhibition :

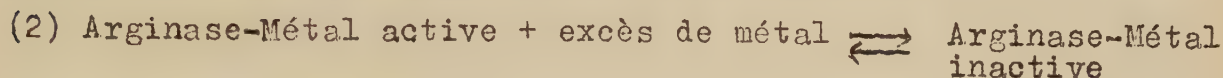
MOHAMED et GREENBERG (161) ont suggéré que l'activation de l'arginase par des cations métalliques reposait sur la réaction :



Ceci est en accord avec les résultats de nos expériences, mais doit être cependant précisé, en insistant sur les points suivants :

a) On ne saurait déduire de la réaction (1) que l'interchangeabilité des métaux se traduit par un simple remplacement de l'un par l'autre dans le composé Arginase-Métal. Les différences établies plus haut entre les métaux susceptibles d'activer l'enzyme laissent plutôt supposer que des modifications de structure apparaissent lors de la transformation d'un composé Arginase-Mn en un composé Arginase-Co.

b) La réaction (1) n'est pas la seule possible avec un même métal. On peut aussi prévoir les suivantes :

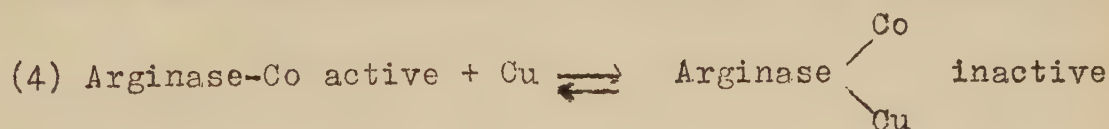


Un excès de substrat serait d'ailleurs susceptible d'influencer cette réaction en déplaçant l'équilibre vers la gauche. Cette réaction (2) n'aurait lieu pour le nickel et le cobalt qu'au-delà d'une concentration optimum du métal.

c) Deux hypothèses peuvent rendre compte de l'inhibition de l'arginase par le cuivre; on peut avoir :



ceci indiquerait que la constante de dissociation du composé Arginase-Cu est inférieure à celle de Arginase-Co. On ne peut calculer directement la première puisque l'arginase dépourvue de métal est inactive (donc sa combinaison au cuivre ne peut être suivie par des mesures d'activité). Cependant on a calculé qu'une arginase douée au départ de son activité maximum perdait 50 % de celle-ci en présence d'une concentration en cuivre égale à $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Des métaux comme Ca et Be pourraient réaliser une semblable réaction, mais avec beaucoup moins d'efficacité (constante de dissociation de Arginase-Ca ou Arginase-Be trop forte). Mais on peut également expliquer l'inhibition par une réaction :



dans laquelle le cuivre se fixerait sur des groupements libres de l'apoenzyme essentiels à l'activité enzymatique (par exemple à la fixation du substrat). Cependant dans le cas du calcium et du béryllium cette hypothèse rend moins bien compte des faits, n'expliquant pas la différence d'action des métaux en fonction de l'activité initiale de l'enzyme (donc de sa teneur en cobalt).

3) Nature de la combinaison arginase-métal :

Les protéines forment fréquemment des complexes avec les métaux lourds : SCHMIDT (197). Un premier indice nous permet de penser que telle est bien la réaction arginase-métal : si l'on opère la réactivation en milieu légèrement alcalin, à une certaine concentration le métal commence à précipiter. L'addition d'arginase inactivée à la solution n'amène pas de changement mais, progressivement, une partie du métal repasse en solution. Or, un tel phénomène a déjà été observé : NEUBERG (142)(164) a signalé que la présence d'acides aminés ou de protéines dans une solution alcaline de métal retardait la précipitation de celui-ci et en a conclu à la formation de complexes.

Sachant que la tendance à la formation de complexes stables dépend, pour un métal, de son rayon ionique r_i et du potentiel à la surface de l'ion E_i , nous avons réuni dans le tableau V les caractéristiques de tous les métaux dont nous avons étudié l'action sur l'arginase.

TABLEAU V : Caractéristiques de différents métaux divalents et leur influence sur l'action de l'arginase

Métaux	n° atom.	série M.	r_i	E_i	Action sur l'arginase
Yttrium	4	II	0,34		inhibe (surtout l'enzyme peu actif)
Magnésium	12	II	0,78		sans action notable
Calcium	20	II	1,06	1,9	inhibe (seulement un enzyme peu actif)
Manganèse	25	VII	0,91		ACTIVE
Chrome	26	VIII	0,83		inhibe à faible concentration
Cobalt	27	VIII	0,82	2,4	ACTIVE
Nickel	28	VIII	0,78	2,5	ACTIVE
Argent	29	I	0,80		INHIBE (même l'enzyme très actif)
Argent	30	II	0,83	2,4	sans action
Barium	48	II	1,03	1,9	sans action
Strontium	82	IV	1,32		sans action

La deuxième colonne indique la série dans laquelle se trouve le métal dans la classification de Mendeleïeff.
Les valeurs de r_i et de E_i ont été empruntées à : WHERRY (244) et PASCAL (168).

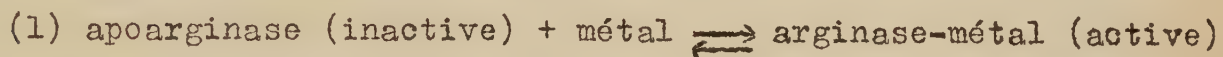
Nous remarquons sur ce tableau que tous les éléments dont l'action sur l'arginase est très nette sont des éléments de numéros atomiques très voisins (de 25 à 29) et que les deux métaux interchangeables Ni et Co sont très proches par toutes leurs caractéristiques. La possibilité d'une différence d'action du cobalt et du manganèse pourrait tenir à leur différence de série ou de rayon ionique. D'autre part, le cuivre pourrait remplacer le cobalt dans l'enzyme (même rayon ionique) et avoir une action différente (série différente). Mais les analogies atomiques entre le fer (et aussi le zinc) et le cobalt ne se traduisent pas par une analogie d'action sur l'enzyme.

En conclusion, si la possibilité d'action d'un métal sur l'arginase semble bien liée à sa tendance à former des complexes stables, d'autres conditions que nous n'avons pu définir déterminent la spécificité d'action du métal.

Chapitre II

ESSAI D'ISOLEMENT et D'ANALYSE DU COMPLEXE APOARGINASE-MÉTAL

Les résultats du chapitre précédent nous ayant fait émettre, après d'autres auteurs, l'hypothèse d'une réaction :



qu'il importe de justifier, nous allons tenter de montrer que l'arginase active est bien une combinaison métallo-protéique et que la réactivation de l'apoarginase se traduit par une fixation de métal. Pour cela, nous nous sommes proposé d'analyser la protéine après réactivation et de montrer qu'il existe des combinaisons définies de l'arginase et du cobalt ou du manganèse.

A/- Technique d'étude :

Nous avons cherché à réactiver l'enzyme, puis à le séparer, sans déplacer l'équilibre Protéine-Métal. Les meilleures conditions pour atteindre ce but ont été les suivantes : l'enzyme totalement inactivé par dialyse est réactivé par le manganèse (10 ml de solution enzymatique + 50 ml de solution tampon au véronal 0,1 M de pH 8,0 + 20 ml de SO_4Mn 0,12 M) ou par le cobalt (10 ml de solution enzymatique + 50 ml de solution saturée de pyrophosphate de sodium de pH 8,0 + 20 ml de CoCl_2 0,077 M). Dans chacun des deux cas, on a préparé deux mélanges de composition identique, dont un seul a été réactivé par incubation de 3 heures à 37°C; l'autre, conservé à 2°C, demeure totalement inactif. Ces milieux ont été ensuite dialysés 3 heures avec agitation à 2°C contre une solution renfermant du sulfate d'ammonium à 10 % de la saturation en ce sel (la solution de

dialyse est changée toutes les heures), puis 18 heures, contre une solution saturée de ce sel. Toutes les solutions de dialyse sont ajustées à pH : 7,2.

Le but de la première dialyse est de séparer de l'enzyme l'excès de sels métalliques employé pour la réactivation, le complexe Protéine-Métal étant très faiblement dissocié au pH choisi. La deuxième dialyse sert à la précipitation de l'enzyme; l'excès de métal ayant été éliminé, on peut espérer qu'il n'y aura qu'une adsorption de métal minime ou nulle sur le précipité protéique. Cette méthode semble ne pas dissocier entièrement la combinaison métallo-protéique car l'enzyme ainsi récupéré reste actif; notons cependant qu'on ne retrouve pas l'activité initiale, mais 40 % de celle-ci environ.

L'enzyme précipité est séparé par centrifugation, repris par l'eau, et ses solutions sont analysées. La teneur en protéine est déterminée au spectrophotomètre Beckman. Celles en manganèse et en cobalt par polarographie après incinération et dissolution des cendres dans une solution 0,2 M de KCl, à pH 7.

Nos réactivations par le cobalt ayant lieu en présence de pyrophosphate, qui forme avec le cobalt un complexe stable, nous avons recherché si la protéine fixe alors en bloc le complexe pyrophosphorique du cobalt, ou bien si celui-ci joue uniquement le rôle de donateur de cobalt à la protéine accepteur. Nous avons donc, en outre, dosé le pyrophosphate fixé par la protéine, par dosage de l'orthophosphate libéré par hydrolyse à chaud avec HCl 2N (Méthode de BRIGGS).

B/- Résultats :

Nous sommes partis de solutions arginasiques de pureté 2300; l'activité est retrouvée à 80 % par réactivation par le manganèse, à 100 % par le cobalt. L'activité de l'enzyme recueilli après dialyse et précipitation est respectivement 50 % et 40 %. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI.

TABLEAU VI : Teneur en métal de combinaisons arginase-métal obtenues par réactivation de l'enzyme.

Arginase-Mn			
Traitement de l'enzyme	Protéines	Mn	Mn pour 100
non incubé	3.600	indosable	néant
incubé	3.600	37	1,02
non incubé	11.700	indosable	néant
incubé	11.700	110	0,94

Arginase-Co					
	Protéines	Co	Co pour 100	P	P pour 100
non incubé	5.845	11,3	0,19	18	0,32
incubé	5.775	28,9	0,50	20	0,34
non incubé	4.050	6,5	0,13	11	0,27
incubé	4.090	19,5	0,47	9	0,22

Chiffres en millièmes de milligramme (X)

On semble bien obtenir des combinaisons assez définies, puisque les taux de manganèse et de cobalt sont très voisins d'un essai à l'autre : 1,0 % de manganèse et 0,5 % de cobalt. Les produits inactivés sont dépourvus de métal et dans la réactivation en solution de pyrophosphate, il est probable que le complexe pyrophosphate-cobalt se dissocie en présence de protéine et au profit de celle-ci; après incubation en effet, la teneur en cobalt est beaucoup plus élevée, tandis que celle en phosphore demeure identique. L'affinité du complexe arginase-cobalt doit donc être grande par rapport à celle du complexe pyrophosphate-cobalt.

Peut-on tirer de ces résultats une valeur de la véritable teneur en métal, des composés arginase-métal ? Non et pour plusieurs raisons :

- la perte d'activité observée pendant la séparation du produit réactivé montre bien qu'il y a eu dissociation du produit actif (aussi bien pendant la dialyse que pendant la précipitation par le sulfate d'ammonium).
- il y a eu adsorption de phosphore et de cobalt sur le précipité protéique, puisque l'on en retrouve sur les préparations qui n'ont pas été incubées;
- la protéine utilisée ne contenait que 50 % d'arginase; on ne peut faire d'hypothèses sur l'action des protéines non arginasiques sur le cobalt.

Ces réserves faites, on peut cependant penser que la valeur moyenne trouvée est une limite inférieure de la teneur en métal cherchée. Donc, que le composé arginase-manganèse comporte plus de 2 atomes-grammes de manganèse pour 10000 g. de protéine, et le composé arginase-cobalt plus d'un atome-gramme de cobalt. Des recherches ultérieures vont nous fournir, à cet égard, une précision plus grande.

Chapitre III

ÉTUDE DU COMPLEXE APOARGINASE-MÉTAL

A/- Données générales sur les réactions Protéine-Métal :

L'intérêt de ces réactions ne se limite pas à l'étude des enzymes à constituant métallique dissociable; il s'étend à toutes les métallo-protéines et, de ce fait, au transport de métaux dans les organismes. Ce qu'il importe de connaître pour chaque molécule ou ion susceptible de se combiner à une protéine peut se résumer en quatre questions :

- combien de cations métalliques sont-ils liés à une molécule de protéine ?
- quelle est l'énergie de liaison correspondante ?
- à quels groupements de la protéine sont liés les cations ?
- quelles sont les liaisons mises en jeu ?

Nous réserverons pour la troisième partie les deux dernières questions. Pour résoudre les deux premières - les plus simples, - nous devons nous adresser à l'une des méthodes suivantes : GREENBERG (75).

1) Méthodes d'étude

- a) Méthodes directes : on fait réagir les deux corps étudiés et l'on détermine la quantité de métal qui reste à l'état libre. On en déduit celle qui a été fixée. On peut opérer par :
- équilibre de dialyse : on dialyse la solution protéique contre une solution d'ions métalliques; le métal resté hors du sac de dialyse est dosé : NORTHROP et KUNITZ (166).
 - détermination du coefficient de partage : on utilise la distribution du métal étudié entre une phase aqueuse contenant

la protéine et une phase organique non miscible : MAIN et SCHMIDT (139), KARUSH (110).

b) Méthodes indirectes : on utilise les modifications apportées à l'une des molécules réagissantes par la réaction :

On peut considérer les variations de masse de la molécule protéique :

- ultracentrifugation : CHANUTIN (31)
- étude de la diffusion de la lumière : PUTZEYS (172) ou ses variations de charge :
- électrophorèse : GORTER (70)

On peut enfin considérer les modifications de propriétés tenant au métal réagissant : la formation d'un complexe va, en effet, entraîner pour la solution réactionnelle des variations des propriétés électroniques ou de l'ionisation, que l'on peut suivre par :

- étude de la conductivité : GREENBERG et SCHMIDT (78). L'ionisation du complexe Protéine-Métal est très incomplète; sa formation amène donc une variation de conductivité de la solution où il prend naissance;
- polarographie : un cation engagé dans un complexe se réduit à un potentiel de décharge très différent de son potentiel usuel. On peut donc suivre très simplement la formation d'un complexe entre le métal et une molécule simple : KOLTHOFF et LINGANE (124). La méthode a été appliquée au cas des protéines par TANFORD (219) (220).
- spectrophotométrie : le remaniement électronique provoqué dans les molécules de métal par la formation d'un complexe peut se traduire par un changement de spectre d'absorption. On peut donc, en faisant varier l'un des facteurs de la réaction (concentration, pH, temps...) suivre les variations du spectre d'absorption. On peut ainsi mettre en évidence et étudier quantitativement les variations de concentrations des corps colorés au cours des réactions. Cette méthode, l'une des plus simples et des plus efficaces pour l'analyse des phénomènes en solution, est malheureusement limitée aux réactions de cations colorés.

Elle a été très fréquemment utilisée pour le cuivre : réaction de biuret avec les protéines : MEHL (148) et tous les travaux de PLEKHAN; parfois aussi pour le fer : WOLFF (248) et le cobalt : FIESS (57).

Nous avons insisté sur ces dernières méthodes car elles présentent l'avantage d'étudier la réaction de façon tout à-fait extérieure, sans en modifier les conditions essentielles.

2) Données stoechiométriques

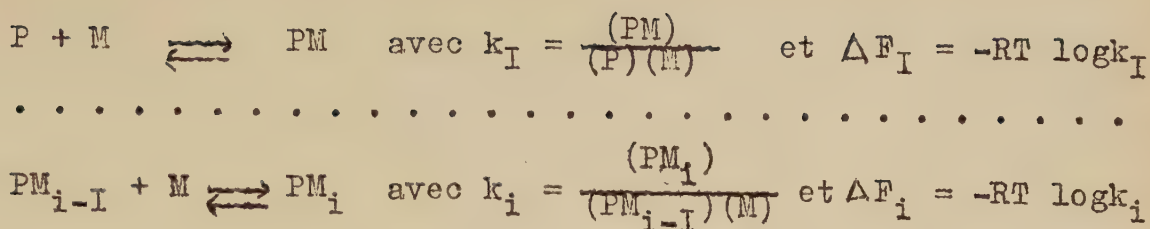
Ces problèmes ont été étudiés par SCHMIDT (197), SCATCHARD (195) et (136), EDSALL (52) et surtout KLOTZ. Nous citerons de celui-ci les études d'ensemble (117), (118) et (119) et les articles récents spécialement orientés vers la thermodynamique des réactions (116), (120) (122) et en collaboration avec FIESS (58).

Les méthodes que nous venons de décrire permettent, avec plus ou moins de facilité, de déterminer le rapport : quantité de métal fixé/quantité de protéine. Il est intéressant d'étudier la variation de ce rapport en fonction de la concentration initiale du milieu en métal. On s'aperçoit qu'en général la quantité de métal fixé augmente avec la concentration en métal, puis tend asymptotiquement vers une fixation limite (par exemple seize molécules de Cu pour une molécule d'albumine).

On peut également comparer la fixation de divers métaux par une même protéine : on trouve ainsi une relation entre les constantes d'affinité des métaux pour la protéine et les constantes d'affinité de ces mêmes métaux pour les petites molécules. Ce qui semble indiquer que la formation du complexe doit être en relation directe avec la présence des groupements polaires des protéines.

3) Données énergétiques

L'étude précédente montre qu'avec un seul métal on peut avoir la suite d'équilibres suivants :



Rappelons que, plus forte est la liaison, plus négative est l'énergie de liaison (en effet plus (PM) est grand, plus k est grand, donc plus la valeur absolue de ΔF est grande)

Variation de ΔF en fonction du nombre d'ions combinés :

L'expérience montre que ΔF décroît en valeur absolue lorsque le nombre d'ions combinés croît (par exemple pour le complexe Cu-albumine $\Delta F_I = -5,908$ et $\Delta F_{16} = -1,722$). Ceci s'explique à partir des deux hypothèses suivantes :

a) Il existe un nombre déterminé n de points d'attache pour le métal sur la protéine : n est limité. Le premier atome, qui se fixe, dispose de n groupements auxquels se lier; le deuxième n'en a plus que n-1; donc la probabilité pour que cette liaison PM_2 se réalise est plus faible, et l'énergie de liaison moins négative (réciproquement PM_2 a deux fois plus de chances de se dissocier).

b) La fixation est due à des forces électrostatiques : or, par la fixation du premier atome de métal, la charge négative de la protéine décroît; son attraction sur le deuxième atome est donc plus faible.

- en fonction du pH :

Lorsque le pH s'élève, la quantité de métal fixé augmente. Cette augmentation, évidente d'après la deuxième hypothèse, est due en effet à l'accroissement de la charge négative de la protéine, donc à celui de l'attraction exercée sur le métal.

- suivant la protéine :

Il existe un parallélisme étroit entre l'affinité d'une protéine pour un même métal et le point iso-électrique de la protéine.

KLOTZ conclut de tous ces résultats qu'il n'est pas besoin d'une configuration particulière de la protéine pour fixer un métal; la liaison de celui-ci se ferait simplement par les chaînes latérales des amino-acides; chacun des groupements libres agirait comme s'il était seul; il s'ajouterait seulement à cette action l'influence électrostatique des groupements voisins.

B/- Recherches personnelles.-

1) Essai d'étude au polarographe :

Au début de notre étude, cette méthode nous a semblé le mieux convenir à notre problème : son emploi s'étend à tous les métaux, dans une très large gamme de concentration et doit offrir une grande précision. Mais nous nous sommes heurté, dès l'abord, à une difficulté : la présence de protéine dans la solution polarographique modifie les conditions de l'expérience. Des phénomènes de tension superficielle, peut-être aussi la formation d'une pellicule protéique à la surface de chaque goutte de mercure entraînent une irréversibilité de la réaction. Celle-ci se traduit par des modifications de pente des vagues observées (voir figure n° 10).

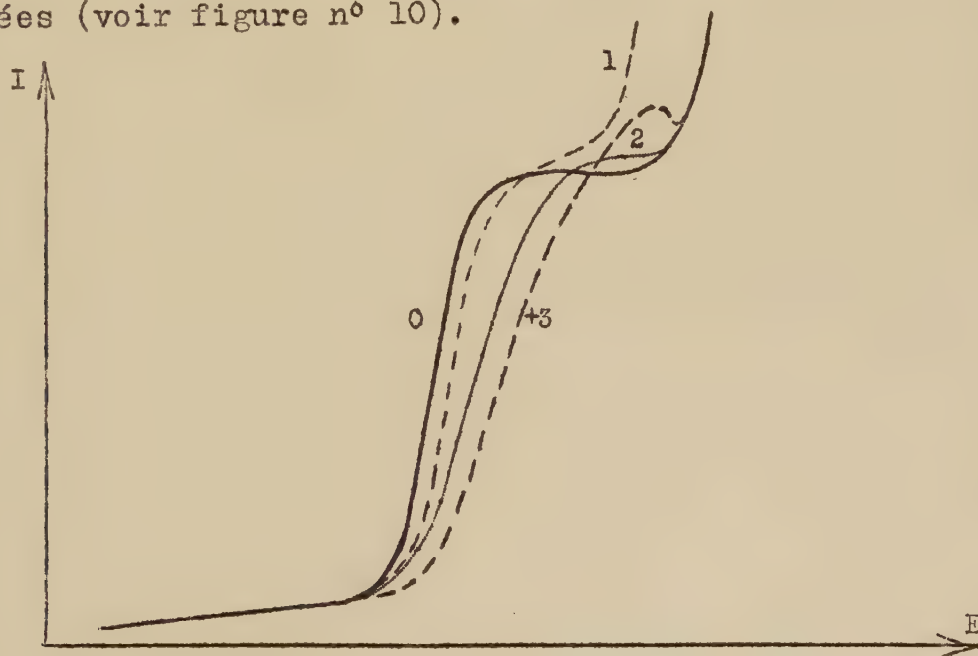


FIGURE 10 : Effet de l'addition d'une protéine sur la vague Polarographique du Cobalt.

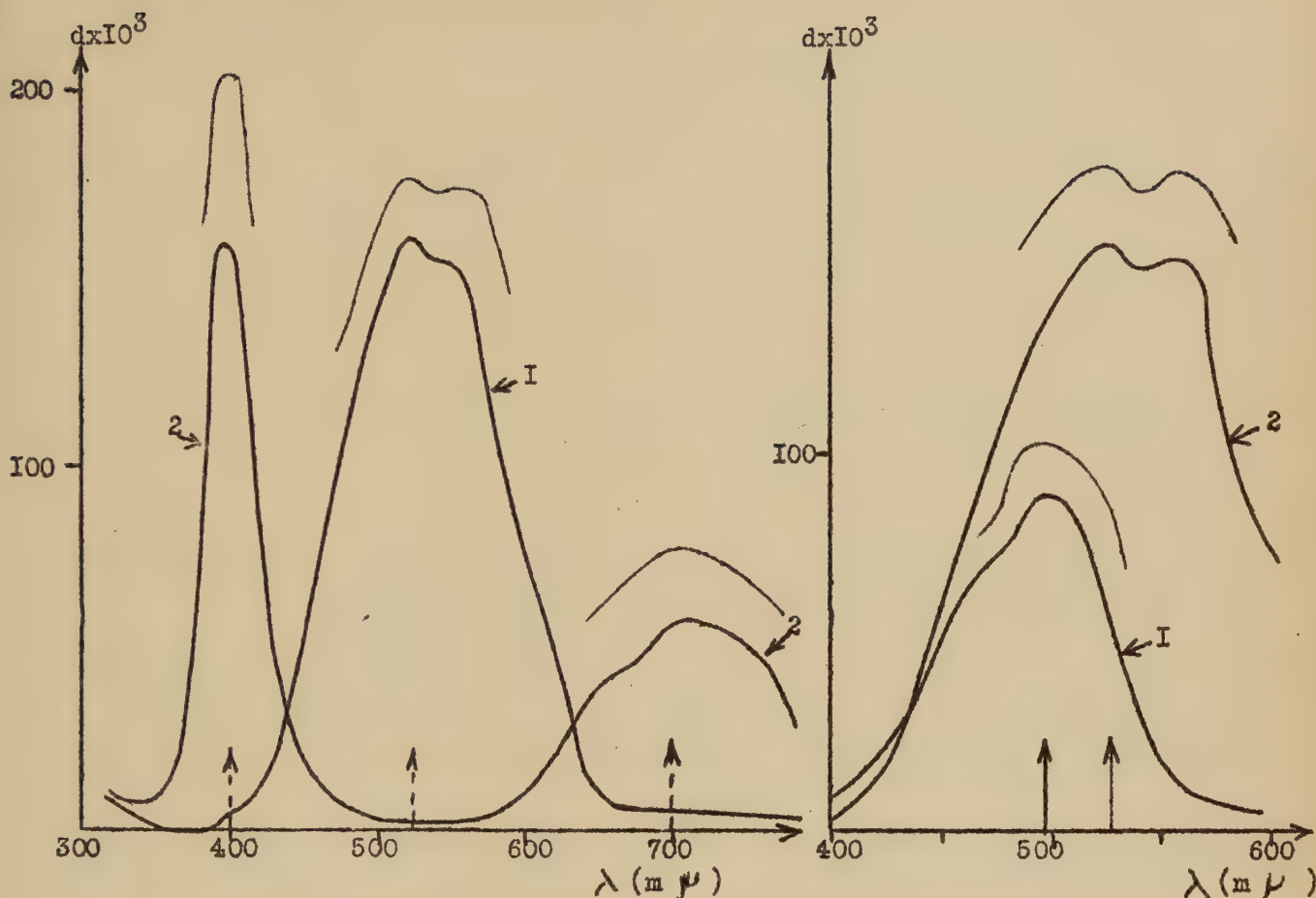
Dans une solution de ClNH_4 0,2 M, amenée à pH 7, on étudie la vague du cobalt ($1,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) en absence (0) ou en présence de quantités croissantes (1 = 0,1; 2 = 0,2; 3 = 0,5 mg/ml) d'apo-

Mais surtout cette irréversibilité enlève toute signification aux phénomènes observés : SOUCHAY et FAUCHERRE (212). Signalons d'ailleurs que TANFORD qui avait envisagé (219) l'application de la méthode à un problème semblable (réaction du cadmium avec des protéines) vient d'aboutir à la même conclusion que nous (221).

2) Etude spectrophotométrique des complexes Cobalt-apoarginase et Nickel-apoarginase :

Cette étude est fondée sur l'observation suivante : si l'on ajoute à une solution de cobalt ou de nickel de l'apo-arginase, on observe une augmentation du coefficient d'extinction moléculaire du métal dissous. Une telle variation rend généralement compte de la formation d'un complexe et s'accompagne, le plus souvent, d'une modification de la forme du spectre (modifications des bandes d'absorption maximum). La première variation est ici l'unique modification observée (figure n° 11), mais des cas semblables ont été signalés, en particulier pour les combinaisons de Co et Ni avec des citrates et des tartrates par BOBSTELSKY et HEITNER (25).

Cette observation a été faite quel que soit le tampon employé : acétate, véronal, pyrophosphate (figure n° 12), bien que les spectres du cobalt dans ces différents tampons soient différents. Nous ne pouvons donc espérer tirer de l'étude du spectre des informations sur la nature des groupements responsables de la formation du complexe. Certains spectres sont, en effet, caractéristiques de liaisons particulières : ainsi pour le cuivre, les liaisons Cu... OOC-R se traduisent par des bandes d'absorption maximum vers 700 mμ.



FIGURES 11 et 12 : Variation des spectres du Cobalt et du Nickel par incubation d'apoarginase.

Abscisses : longueur d'onde (en mμ)

Ordonnées : densité optique $\log. \frac{I_0}{I}$

Tracé continu : spectre du métal seul

Tracé pointillé : spectre en présence d'apoarginase

Courbe 1 : Co $2 \cdot 10^{-2}M$ Courbe 1 : Co $2 \cdot 10^{-2}M$ dans du véronal

Courbe 2 : Ni $2 \cdot 10^{-2}M$ Courbe 2 : " " dans du pyrophosphate

a) Variation en fonction du temps :

Si l'on suit (figure n° 13) la variation de densité optique d'une solution de cobalt dans laquelle incube de l'apoarginase, on note qu'après les vingt premières minutes, l'augmentation de d croît régulièrement et tend vers une limite, qui est presque atteinte au bout de 3 heures. Cette variation

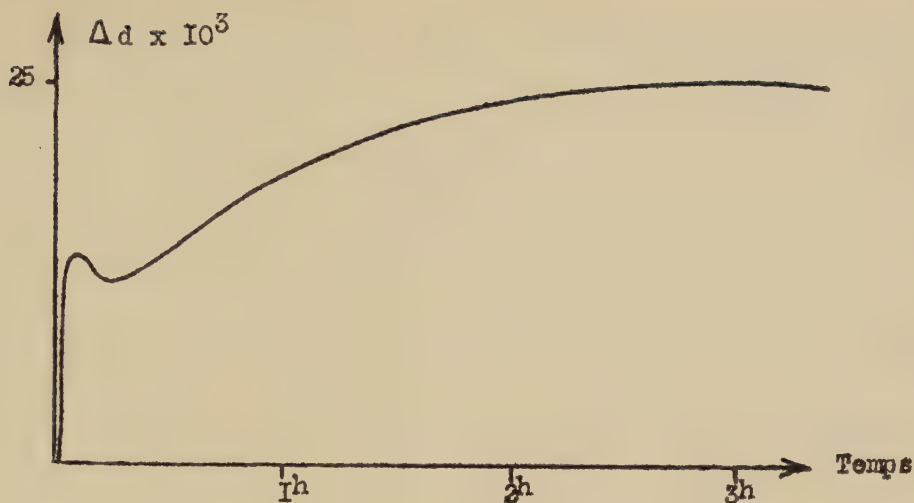


FIGURE 13 : Variation, en fonction du temps, de la densité-Optique d'une solution de Cobalt où incube de l'apoarginase.

Abscisses : temps d'incubation.

Ordonnées : variation de d à 524 mμ.

C'est une solution où $(Co) = 10^{-2}M$ dans laquelle on a mis à incuber à $t = 0,06$ mg d'apoarginase - température = 25° .

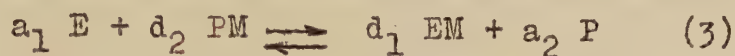
du coefficient moléculaire du métal traduit donc une réaction d'équilibre.

b) Variation en fonction de la concentration en métal :

Notons d'abord que nous avons choisi comme tampon le pyrophosphate de sodium, dont les complexes de cobalt et de nickel sont solubles à des pH supérieurs à 7,5 auxquels ces métaux précipitent à l'état d'hydrate en solution pure. Le seul inconvénient de l'emploi du pyrophosphate est que l'étude de la réaction de réactivation n'a pu être réalisée à son pH optimum (7,5) car, à ce pH, le pyrophosphate est dépourvu de pouvoir tampon. En sa présence, on peut se représenter la réaction qui s'opère dans notre mélange d'incubation, de la manière suivante: si l'on considère que l'apoarginase (E) et le pyrophosphate (P) sont tous deux susceptibles de fixer du cobalt ou du nickel (M) pour donner des complexes EM et PM suivant les réactions :



ces deux systèmes réagiront ensemble selon :



les coefficients vérifieront les égalités :

$$\frac{a_1}{\alpha_1} = \frac{d_1}{\delta_1} = \frac{n_1}{n} \quad \text{et} \quad \frac{a_2}{\alpha_2} = \frac{d_2}{\delta_2} = \frac{n_2}{n}$$

n étant le nombre de particules échangées dans la réaction.

La constante d'équilibre sera :

$$K = \left(\frac{\frac{1}{n_2}}{\frac{1}{n_1}} \right)^n \frac{K_2}{K_1}$$

Les deux composés PM et EM sont colorés. Les densités optiques sont des fonctions linéaires des concentrations et additives.

On aura ainsi : $d_{\text{optique}} = \xi_2 (PM) + \xi_1 (EM)$ si ξ_2 et ξ_1 sont respectivement les coefficients d'extinction moléculaire du métal dans les composés EM et PM.

Nous avons poursuivi notre étude à pH 8,4. A ce pH, en tampon pyrophosphate à 8 %, les spectres du cobalt et du nickel se caractérisent (figure n° 11), le premier par un sommet net à 524 mμ, le second par un sommet très aigu à 400 mμ et une bande très large et très aplatie au-delà de 600 mμ. C'est à 524 mμ (Co) et à 400 mμ (Ni) que nos lectures ont été faites.

Nous avons étudié en fonction de la concentration en métal les variations de $\Delta d = d_{MP} - d_M - d_P$, d_{MP} , d_M , d_P étant respectivement les densités optiques, après 3 heures à 30°C, donc à l'équilibre, de 3 solutions dont les concentrations en métal et en apoarginase sont (m;p), (m;0), (0;p). Nous avons réuni dans le tableau VII les résultats de 2 séries d'expériences faites l'une sur le cobalt, l'autre sur le nickel; cette

TABLEAU VII : Variation de la densité optique de solutions de Cobalt et de Nickel en présence d'apoarginase

m	Cobalt $d_p = 0$ (524 mμ)			Nickel $d_p = 14$ (400 mμ)		
	$d_M \cdot 10^3$	$d_{MP} \cdot 10^3$	$d \cdot 10^3$	$d_M \cdot 10^3$	$d_{MP} \cdot 10^3$	$d \cdot 10^3$
$1 \cdot 10^{-3} M$	8	15	7	7	27	6
2	16	23	7	13	35	8
4	32	39	7	26	48	8
5	40	48	8	33	55	8
6	48	56	8	40	63	9
10	80	92	12	66	93	13
15	120	137	17	99	131	18
20	160	181	21	132	169	23
30	240	262	22	198	235	23
50	400	422	22	330	368	24

d_{MP} , d_M , d_p densités optiques, après 3 h. à 30°C, de solutions dont les concentrations en métal et en apoarginase sont respectivement : (m,p), (m,0), (0,p).
0,48 mg/ml d'apoarginase = p.

deuxième expérience est d'ailleurs également illustrée par la figure n° 14.

c) Variation en fonction de la concentration en apoarginase :

Nous avons étudié, pour deux concentrations de cobalt ($2 \cdot 10^{-3} M$ et $5 \cdot 10^{-3} M$) les variations de densité optique qu'entraînaient des concentrations différentes d'apoarginase. Les conditions expérimentales étaient les mêmes que précédemment. Les résultats sont réunis sur la figure n° 15.

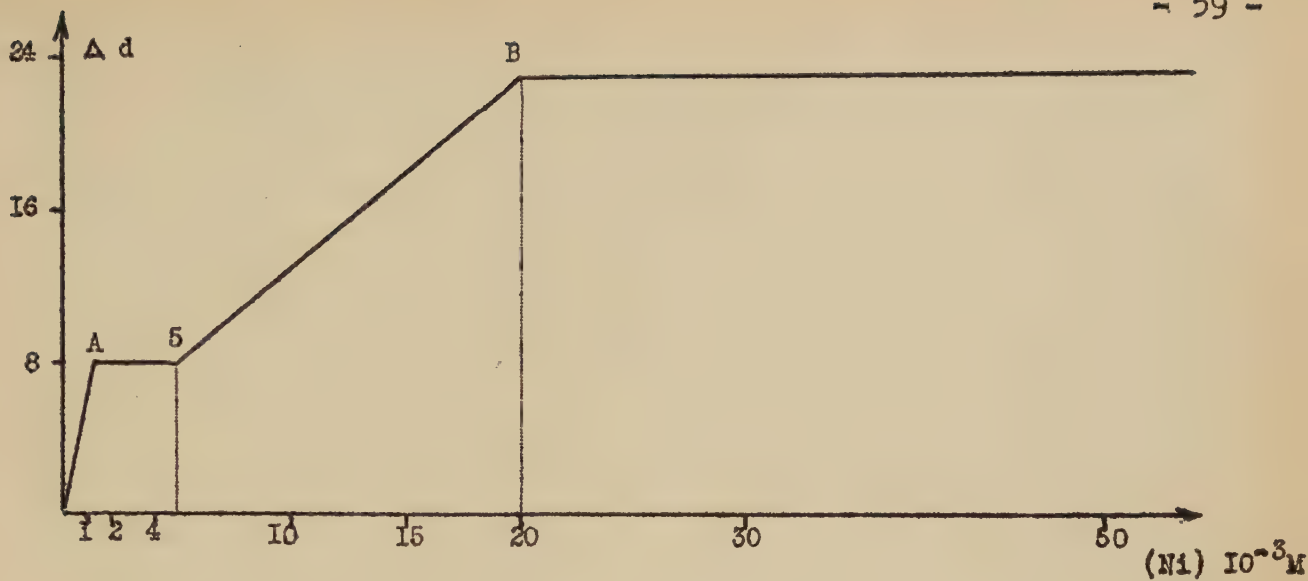


FIGURE 14 : Variation de la densité optique apportée par incubation d'apoarginase dans des solutions de Nickel.
 Abscisses : concentration en nickel du milieu d'incubation
 Ordonnées : $\Delta d = d_{MP} - d_P - d_M$
 on a partout une concentration de 0,48 mg d'apoarginase par ml.

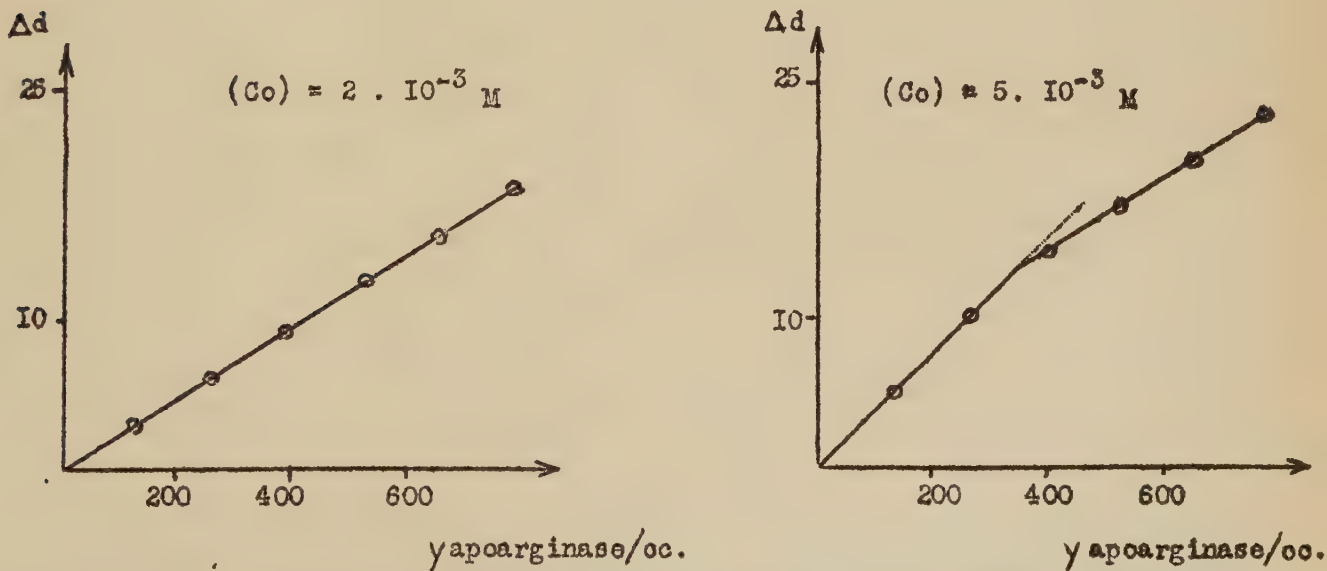


FIGURE 15 : Variation de la densité optique apportée par incubation d'apoarginase dans des solutions de Cobalt.
 Abscisses : concentration en apoarginase
 Ordonnées : $\Delta d = d_{MP} - d_M - d_P$
 à gauche $(Co) = 2 \cdot 10^{-3} M$ à droite $(Co) = 5 \cdot 10^{-3} M$

d) Conclusion :

L'examen de la figure 14 traduit l'existence de deux réactions : l'une, aux faibles concentrations de métal; l'autre semblant commencer seulement vers une concentration de $5.10^{-3}M$. Ceci nous permet de dire qu'il existe deux réactions du type (3), donc deux du type (1) : l'apoarginase est dès lors susceptible de former deux complexes différents avec le cobalt et le nickel. L'un de ces complexes se formerait seul à de faibles concentrations en métal; au-delà d'un seuil de concentration en celui-ci, un autre prendrait naissance.

Ce fait apparaît d'ailleurs également sur la figure n° 15, par le contraste entre les courbes $\Delta d = f([P])$ correspondant à deux concentrations en cobalt choisies de part et d'autre de la valeur limite.

L'aspect linéaire des courbes déterminées (toutes sont formées d'une ou plusieurs droites) prouve que la réaction est pratiquement quantitative, ce dont on peut déduire que: $K_1 \gg K_2$. Ceci va nous permettre de calculer la composition des complexes formés. En effet, les points d'intersection A, B (figure n° 14) et C (figure n° 15) sont les points équivalents de nos réactions : tout le métal est présent dans la solution sous forme de complexe $(EM)_1$ en A et sous forme de combinaison $(EM)_2$ en B et en C. Nous pouvons ainsi définir l'ordre de grandeur de la quantité de métal fixée sur la protéine dans les deux cas, par le nombre n d'atomes-grammes de métal combinés à 10.000 g. d'apoarginase⁽¹⁾.

pour le cobalt	$n_1 = 18$	pour le nickel	$n_1 = 26$
	$n_2 = 190$		$n_2 = 190$

(1) Dans toutes ces questions, les quantités indiquées d'arginase sont seulement approchées : on les déduit de la quantité de protéine présente et de la connaissance de la teneur de la protéine en arginase. On admet, et cela se justifie comme on le verra plus loin, que les autres protéines ont une action négligeable.

Comme nous l'avions prévu, ces chiffres sont très différents de ceux du chapitre précédent (p. 48). Ceci est dû vraisemblablement à une dissociation du complexe, lors de la séparation de l'enzyme du milieu activateur. La théorie exposée plus haut nous a appris en effet que plus un complexe est chargé, moins il est stable : seuls les atomes de métal les plus fortement fixés sont restés sur la molécule protéique. Il faut, d'autre part, noter que les quantités de métal fixées sont extrêmement importantes : la fixation de 190 atomes de métal sur environ 100 restes d'acides aminés ne peut s'expliquer uniquement par les forces de valences ou les forces de VAN DER WAALS; peut-être peut-on voir là une manifestation de ces attractions à grande distance, que WINTER (247) a signalées dans le cas des macromolécules : ces forces, selon lui, favoriseraient la formation d'essaims de molécules, lesquels présenteraient au voisinage de la macromolécule des structures sélectionnées. L'existence de ces forces a d'ailleurs permis à GOUDOT (71)(72) de rendre compte des phénomènes de catalyse dans les systèmes protéiques.

Nous pouvons enfin déterminer graphiquement, ou par le calcul, le seuil de concentration au-delà duquel se forme le deuxième complexe. Pour plus de précision, il nous faut remonter aux équations qui donnent d_{MP} en fonction de m :

$$\text{cobalt} \quad d_{MP} = 8 m + 7 \qquad \text{nickel} \quad d_{MP} = 6,6 m + 22$$

$$\text{puis} \quad d_{MP} = 8,9 m + 3 \qquad \text{puis} \quad d_{MP} = 7,5 m + 18$$

dans les deux cas, l'intersection a lieu pour le point S tel que :

$$0,9 m = 4 \qquad m = 4,4$$

Le seuil m_s du deuxième complexe serait donc une concentration de $4,4 \cdot 10^{-3} M$ en métal. La précision du calcul permet d'assurer que $4 \cdot 10^{-3} M < m_s < 5 \cdot 10^{-3} M$; d'autre part, au cours de nos très nombreuses expériences, nous avons le plus souvent retrouvé les valeurs de 4,3 et 4,4, qui semblent les plus probables.

La réaction enfin semble spécifique, dans le sens que l'apoarginase semble bien tenir la propriété de donner les complexes étudiés de son caractère propre : une protéine inactive comme l'ovalbumine nous a donné une réaction colorée infiniment moins prononcée, la fixation de cobalt étant très faible (résultats confirmés par le travail de FIESS (57)). De même une apoarginase obtenue par une dialyse de 5 heures, donc irréversiblement inactivée, n'a pas modifié la densité des solutions de cobalt ou de nickel.

3) Etude au spectrophotomètre de la réaction Cuivre-Arginase :

L'addition d'arginase à une solution de complexe pyrophosphate-cuivre ne modifie absolument pas les propriétés optiques de la solution. Il semble que la réaction (3) dans le cas de Cu n'ait pratiquement pas lieu. Mais si l'on détermine l'activité de la solution, on s'aperçoit que l'activité de l'arginase n'est pas influencée, en milieu pyrophosphate, par la présence du cuivre :

On en déduit donc que cette fois $K_1 \ll K_2$

Nous n'avons pas employé la méthode dans un autre tampon qui ne retiendrait pas Cu sous forme de complexe, la précipitation du cuivre commençant dès pH 5,6 (elle est totale à pH 7,1).

4) Etude de la réaction Manganèse-Apoarginase par la méthode d'équilibre par dialyse :

L'absence de coloration des sels de manganèse nous a obligés à adopter une autre méthode : celle de l'équilibre de membrane. Nous avons dialysé contre 40 ml d'une solution tampon au véronal à pH 8 (afin d'éviter la précipitation de Mn qui commence à 8,4), chargée de quantités variables de SO_4Mn , 10 ml de solution d'apoarginase. Chaque expérience est doublée par une dialyse dans laquelle le milieu extérieur est inchangé, mais la solution protéique remplacée par 10 ml d'eau bidistillée. La dialyse est poursuivie une nuit à 15°C. On analyse ensuite les solutions extérieures dans lesquelles on dose le manganèse :

soient c_o et c_p (en mg/ml) les concentrations de manganèse trouvées dans le milieu extérieur après dialyse respectivement contre H_2O et la solution protéique. On admet que la quantité de métal fixée sur la protéine est : $50 (c_o - c_p)$ mg (il n'y a pas de corrections à faire pour l'équilibre de DONNAN puisque nous sommes en présence d'une solution suffisamment concentrée en sel : $ClNa$ M/10 dans le tampon).

On dose Mn de la façon suivante :

à 5 ml de solution contenant Mn on ajoute 1 ml de SO_4H_2 , 1 ml de PO_4H_3 et 3 ml d' H_2O . On ajoute 30 à 40 mg de périodate de K : IO_4K et on chauffe à 90° : la coloration développée est appréciée par lecture au spectrophotomètre à 530 mp.

Nous donnons dans le tableau VIII les résultats d'une expérience dans laquelle on employait dans chaque cas de dialyse 18,835 mg d'apoarginase.

TABEAU VIII : Fixation de Manganèse sur l'Arginase

(Mn) initiale	$c_o \cdot 10^3$	$c_p \cdot 10^3$	Mn fixé par apoarginase	
			sur 18,835 mg	sur 10.000 g
1. $10^{-4}M$	5,5	0,772	236,4 γ	2,28 at-g
2. 10^{-4}	11	3,18	391	3,77
5. 10^{-4}	27,5	12,82	734	7,08
7. 10^{-4}	38,5	23,64	743	7,17
1. 10^{-3}	55	39,94	753	7,26
2. 10^{-3}	110	79,4	1530	14,7

Il semble bien qu'ici aussi nous nous trouvons en présence de plusieurs complexes : le premier, à faible concentration de manganèse, comporterait 7 atomes-grammes de Mn pour 10.000 g d'apoarginase. Le second serait beaucoup plus riche en manganèse et commencerait à se former dès que la concentration en Mn dépasserait $10^{-3}M$.

On peut, d'après ces résultats, déterminer une valeur approximative de la constante d'équilibre : en employant les deux premiers points ci-dessus choisis pour leur éloignement du point équivalent, on trouve que :

$$\frac{(\text{Mn libre}) (\text{Protéine libre})}{(\text{Protéine combinée})} \sim 4.10^{-5} \text{M}$$

(on trouve 3.10^{-5} pour le premier et 5.10^{-5} pour le second)

C/- Discussion des Résultats.

L'apoarginase incubée avec un sel métallique (Co, Ni, Mn) se réactive : la réaction est une réaction d'équilibre qui se produit assez lentement; de plus, il semble qu'il puisse exister deux réactions différentes puisque, en présence de certaines concentrations de substrat, l'addition de Co (ou de Ni) augmente d'abord l'activité puis la diminue. D'autre part, l'étude physico-chimique de l'activation nous montre que chacun des trois métaux est susceptible de former avec l'apoarginase, deux complexes différents par leur teneur en métal. Un parallélisme certain apparaît encore plus nettement si l'on réunit sur une même figure (n° 16) les résultats de l'étude d'activation et ceux de l'étude de la formation des complexes.

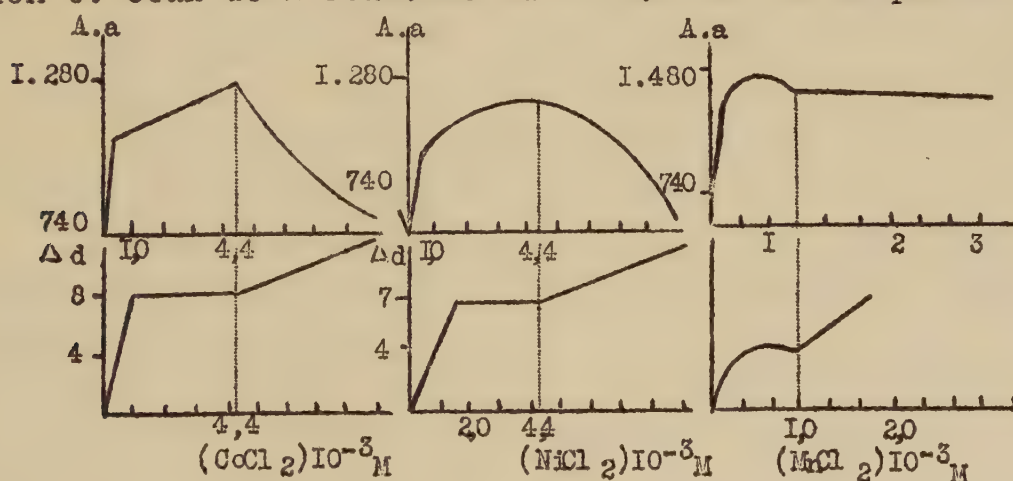


FIGURE 16 : Fixation de Co^{++} , Ni^{++} et Mn^{++} et réactivation de l'apoarginase par addition de sels de Co, Ni, ou Mn à diverses concentrations.

Abscisses : concentration moléculaire en sel métallique (10^{-3}M)
 Ordonnées : courbes supérieures : - activité arginasique
 " inférieures : - variation de densité optique pour la fixation de Co ou Ni. - atomes-grammes de Mn se combinant à 10^4g de protéine.

Le seuil de concentration en métal au-delà duquel se forme le second complexe correspond au point pour lequel le rôle du métal dans l'activation s'inverse (pour le cobalt et le nickel). Dans le cas de ces deux métaux il semble donc que le premier complexe, qui existe à de faibles concentrations en métal, est seul catalytiquement actif et qu'il se transforme en une autre combinaison, inactive, en présence d'un excès de sel. Pour le manganèse au contraire, le second complexe semble aussi actif que le premier.

Ces résultats , qui corroborent l'hypothèse que nous avons faite liant l'activation de l'enzyme à la formation d'un complexe métalloprotéique, semblent avoir une valeur générale. MALMSTROM a, depuis, publié une note (140) (141) sur l'interaction du manganèse et de l'énolase où il laisse prévoir l'existence de deux types de complexes, l'un actif et l'autre non.

Il reste maintenant à éclaircir deux points :

- la raison de la différence d'activité des deux complexes dans le cas du cobalt et du nickel et de leur identité d'action dans celui du manganèse,
- la raison pour laquelle l'activité arginasique croît au-delà du point équivalent : en effet, il n'existe pratiquement plus d'apoarginase en solution en ce point; on devrait donc atteindre l'activité maximum dès ce moment et s'y tenir jusqu'au début de la formation du second complexe.

Ces questions recevront une réponse au chapitre suivant, lorsque nous étudierons le comportement des complexes en présence du substrat.

Chapitre IV

ÉTUDE DU COMPLEXE APOARGINASE-MÉTAL-SUBSTRAT

Sur le comportement du complexe enzymatique : protéine-métal, en présence du substrat, il n'existe à ce jour que les hypothèses de HELLERMAN et de SMITH, que nous avons rapportées plus haut. Elles assignent au métal un rôle dans la fixation du substrat sur l'enzyme, que nous avons entrepris de démontrer et de préciser.

A/- Recherches personnelles :

1) Remarque préliminaire :

Si, après son incubation, on ajoute au mélange apo-arginase-cobalt de la L(+)-arginine, il se produit une très nette augmentation du coefficient d'extinction moléculaire du cobalt. Cette augmentation est immédiate et atteint très vite (moins de 5 minutes) une valeur stable. Elle s'accompagne d'ailleurs d'une modification du spectre (figure n° 17) : le contour en est transformé mais cependant la longueur d'onde d'absorption maximum est encore 524 mμ. Pour le nickel, au contraire, on note, en plus de l'accroissement de la densité optique, un déplacement de la longueur d'onde d'absorption maximum : figure n° 18; ainsi, en l'absence d'arginine, ou en présence de concentrations d'arginine inférieures à $1.10^{-2}M$, le maximum est à 400 mμ; en présence de concentration d'arginine de $2,85.10^{-2}M$, il se situe à 390 mμ; enfin lorsque la concentration d'arginine dépasse $5,7.10^{-2}M$, il est à 380 mμ. Nous avons toujours retenu pour nos lectures la valeur maximum de la densité optique.

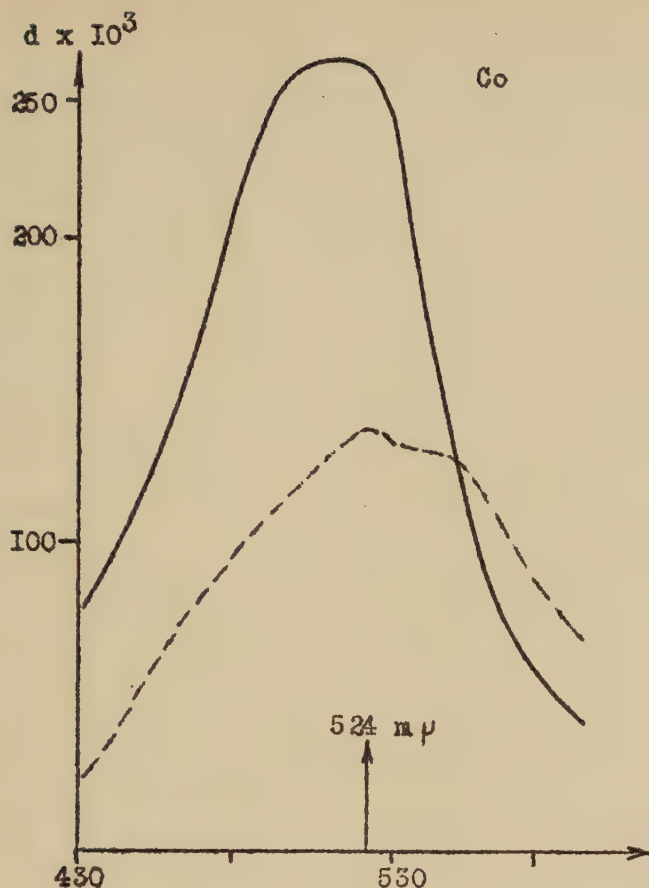


FIGURE 17 : Spectre du cobalt en présence d'apoarginase et de L(+)-arginine

Abscisses : longueurs d'onde

Ordonnées : densité optique

Tracé discontinu : spectre du métal seul

Tracé continu : spectre du métal en présence d'apoarginase (1 mg/ml) et de L(+)-arginine (0,115 M).

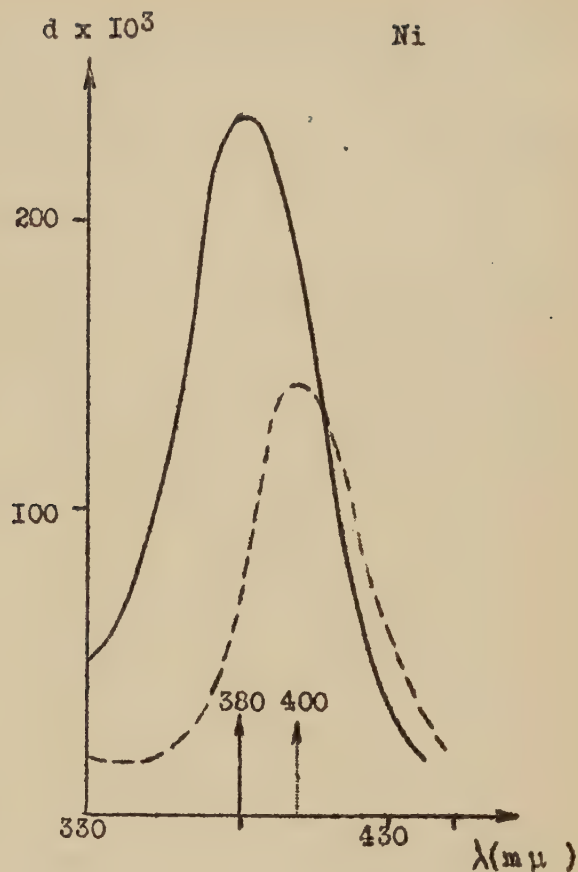


FIGURE 18 : Spectre du nickel en présence d'apoarginase et de L(+)-arginine

Nous pouvons déduire de ces faits que le métal a participé à la réaction, c'est-à-dire à la fixation du substrat sur l'enzyme :

à la réaction $E + PM \rightleftharpoons EM + P$ (3), s'est ajoutée

la réaction $EM + S \rightleftharpoons EMS$ (4), avec apparition d'un nouveau composé coloré EMS.

Si m est la quantité initiale de PM dans la solution, e la quantité de EM formée dans la réaction (3) et t la quantité de EMS formée dans la réaction (4), on a (en supposant $d_P = 0$) :

$$d_M = m \xi_2$$

$$d_{MP} = (m-e) \xi_2 + e \xi_1 \quad d = e(\xi_1 - \xi_2)$$

$$d_{MPS} = (m-e) \xi_2 + (e-t) \xi_1 + t \xi_3$$

et ξ_3 est le coefficient d'extinction moléculaire du cobalt dans EMS.

$$\text{Donc } \Delta d_S = d_{MPS} - d_{MP} = t(\xi_3 - \xi_1)$$

sera proportionnel à la quantité de EMS formé.

Nous observerons les variations Δd_S comme suit : soient deux solutions identiques d'incubation (apoarginase + métal). On ajoutera dans l'une un volume d'eau, dans l'autre un volume égal d'une solution de L(+)-arginine. La différence de densité optique entre les deux solutions donnera Δd_S . On lit au spectrophotomètre dix minutes après l'addition de L(+)-arginine (nous verrons en effet, plus loin, que dans certains cas, d varie ultérieurement).

Notre étude a consisté à faire varier successivement l'un des paramètres de la réaction : le temps et les concentrations.

2) Variation en fonction du temps :

Si nous répétons la lecture de densité optique au bout de temps plus ou moins longs, nous ne constatons aucun changement dans les cas suivants :

- solutions de Nickel
- solutions de cobalt sans protéines
- solutions de cobalt plus L(+)-arginine à faible concentration
- solutions de cobalt pour lesquelles $(Co) < 5.10^{-3}M$

Dans les autres cas (solution de cobalt concentrée, additionnée de protéines et d'arginine concentrée) on fait 2

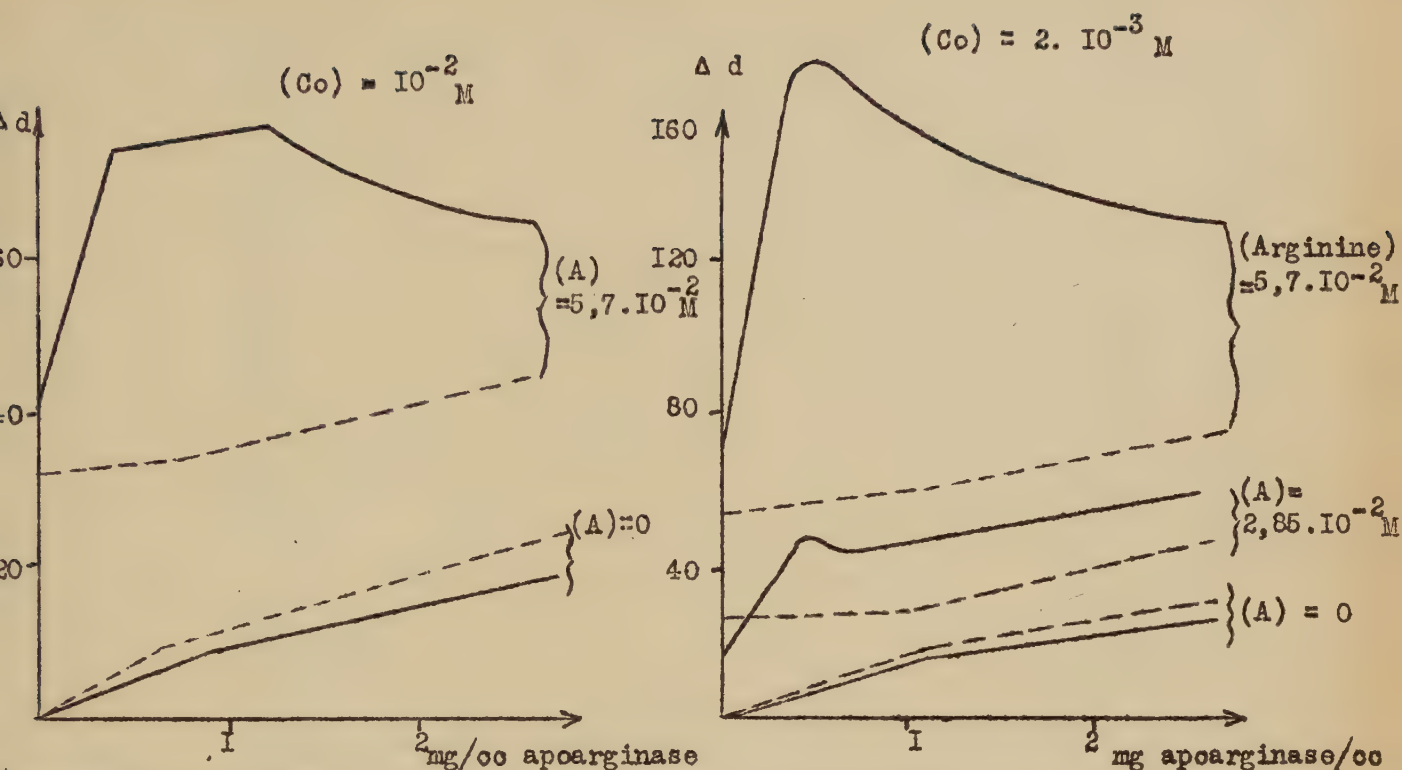


FIGURE 19 : Action du temps sur la densité optique de solutions concentrées de cobalt additionnées d'apoarginase et de L(+)-arginine.
 $t = 0$ courbes discontinues
 $t = 18$ heures courbes continues
 Abscisses : concentration en apoarginase
 Ordonnées : Δd

lectures, l'une 10 minutes après addition d'arginine; l'autre 18 heures après. On a porté sur la figure 19 les modifications apportées par le temps aux propriétés optiques des solutions de concentration supérieures à $5 \cdot 10^{-3} M$.

Nous n'avons pu, jusqu'ici, expliquer ce phénomène extrêmement lent qui est, semble-t-il, étranger au problème étudié : on aurait pu penser en effet que, en raison de l'excès de cobalt, la L(+)-arginine n'était pas hydrolysée et, par oxydation due au contact prolongé de l'air, formait un complexe cobaltique. Mais nous avons suivi simultanément la disparition de la L(+)-arginine et l'augmentation de densité optique, et constaté que la disparition totale de l'arginine se traduit à peine

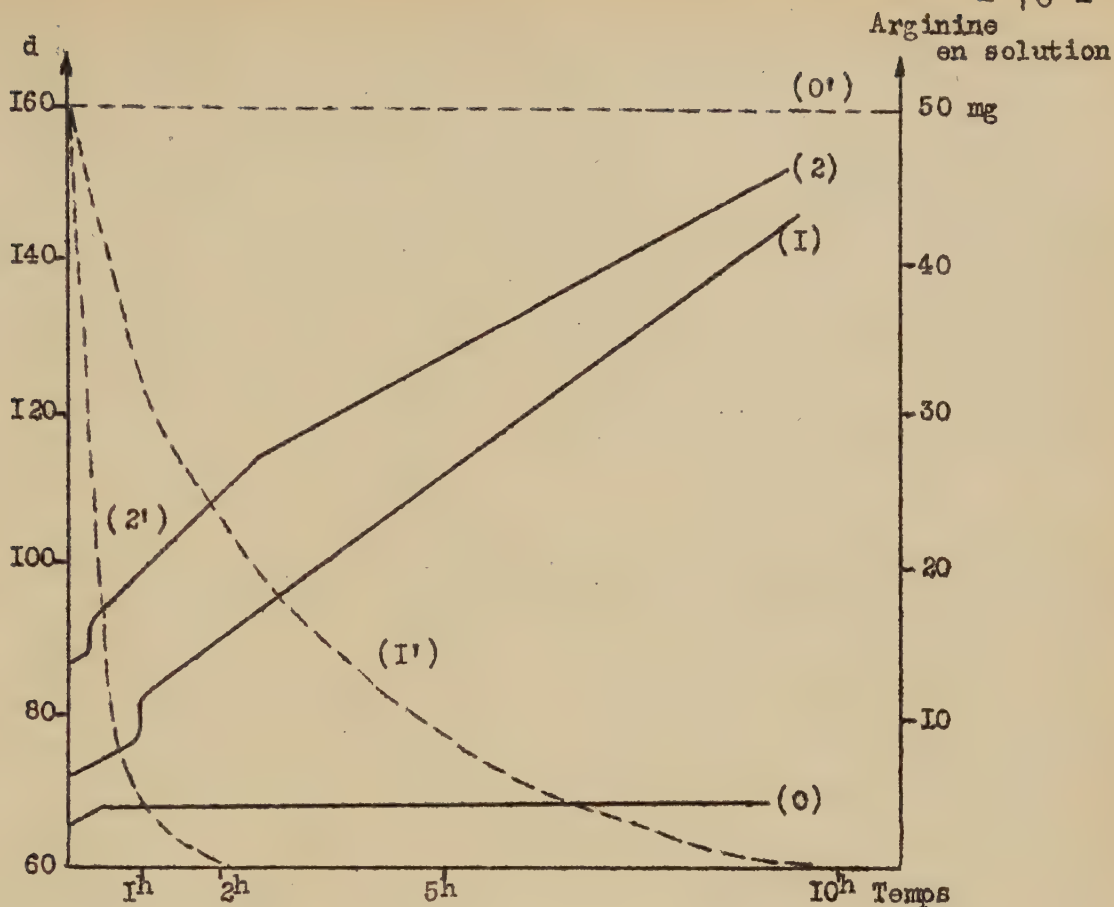


FIGURE 20 : Disparition de L(+)arginine et augmentation de la densité optique dans une solution apoarginase -Co - L(+)arginine en fonction du temps.

Abscisses : temps en heures

Ordonnées : (tracé continu) variation de la densité optique
(tracé discontinu) mg L(+)arginine restant en solution.

On a au départ {Co} = $2 \cdot 10^{-2} M$

{arginine} = $5,7 \cdot 10^{-2} M$

et {protéine} courbes 0 = 0

" 1 = 0,13 mg/ml

" 2 = 0,84 mg/ml

par un point anguleux dans la variation de d (figure n° 20).

On ne saurait, non plus, envisager comme cause de ce phénomène la présence d'ornithine ou d'urée dans la solution : des essais réalisés directement avec ces corps ou avec l'acide arginique (autre substrat, libérant également de l'urée) n'ont pas donné

lieu au phénomène attendu. Une autre explication doit donc être cherchée, qui n'apparaît pas clairement.

Beaucoup plus intéressante est la stabilité de la densité optique dans les autres solutions : elle indique en effet que le complexe dans lequel est engagé le métal demeure stable pendant la durée de l'hydrolyse et persiste après la fin de celle-ci; ceci suggère que l'arginine engagée tout d'abord dans le complexe Protéine-Métal-Substrat y est remplacée par un produit d'hydrolyse : c'est ce que nous établirons dans le chapitre suivant.

3) Variation en fonction de la concentration en substrat :

Répetons d'abord l'expérience précédente en gardant la même solution de complexe apoarginase-métal, mais en faisant varier la concentration en L(+)-arginine. De faibles concentrations en L(+)-arginine n'entraînent aucune variation de d ; puis, lorsque la concentration (s) dépasse un seuil s_m , apparaît une variation Δd_s proportionnelle à s . Si cette observation est reproduite à diverses concentrations en cobalt (m) - figure n° 21 - s_m varie avec m : s_m est alors inversement proportionnel à l'activité du complexe formé à la concentration m ; ceci est encore confirmé par le fait que s_m se révèle inversement proportionnel à e , quand on fait varier la concentration e d'apoarginase. Ainsi s_m est-il lié à l'affinité de l'enzyme pour le substrat, et par là à l'activité arginase.

La réaction que nous observons est donc bien la réaction prévue : c'est le composé EM, et non le seul métal, qui fixe le substrat. Ceci se vérifie d'ailleurs si, l'on met en présence du cobalt et de la L(+)-arginine seuls : on n'enregistre qu'une faible variation de d (figure n° 21, tracé discontinu), qui traduit la formation d'un complexe peu stable: BRIGANDO a d'ailleurs montré (27), que des complexes stables ne se forment entre l'arginine et le cobalt que par oxydation.

Notons enfin qu'au-delà des s_m respectifs, les variations de d observées sont proportionnelles à s , mais aussi à m .

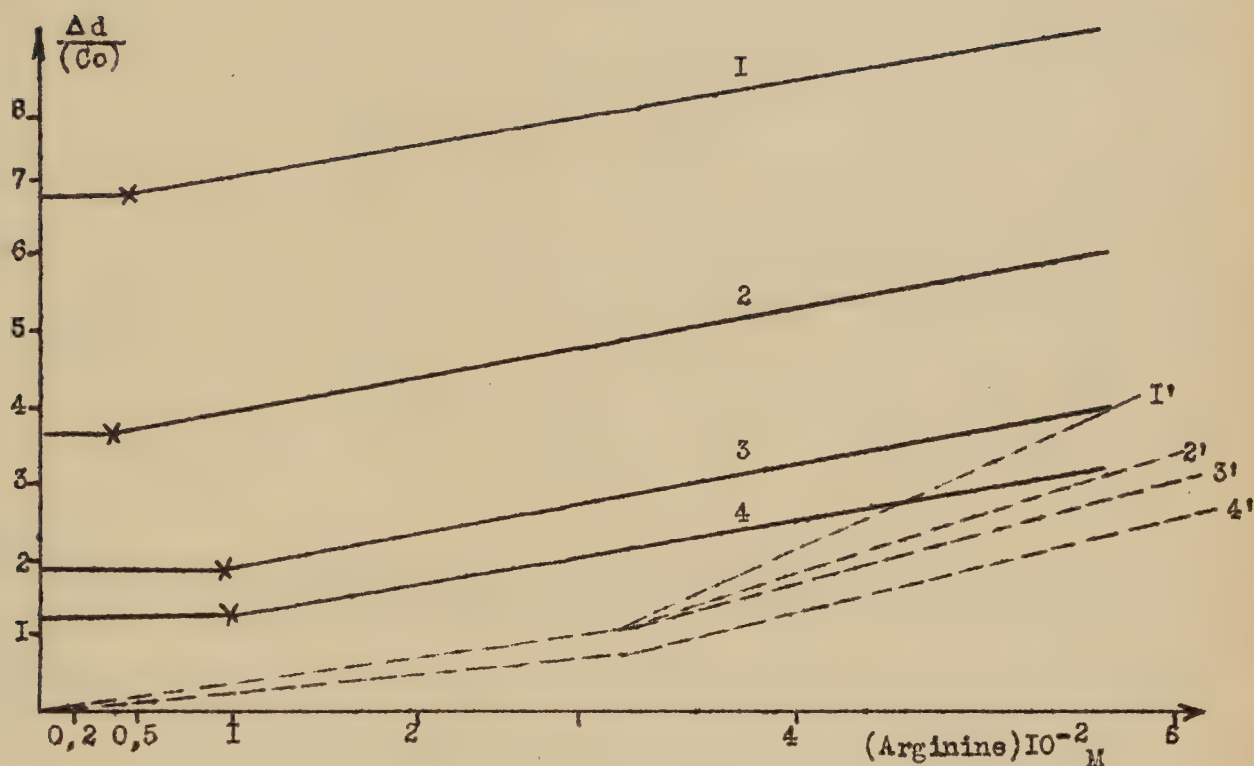


FIGURE 21 : Variation du coefficient d'extinction moléculaire du cobalt en présence de L(+)-arginine (tracés discontinus) ou de L(+)-arginine + arginase (tracés continus)

Abscisses : concentration en L(+)-arginine ($10^{-2}M$)

Ordonnées : $\Delta d/(Co)$ si $\Delta d = d_{MPS} - d_M$

Courbes 1 et 1' : $(Co) = 2 \cdot 10^{-3}M$ 3 et 3' $(Co) = 1 \cdot 10^{-2}M$

2 et 2' $= 4 \cdot 10^{-3}M$ 4 et 4' $= 2 \cdot 10^{-2}M$

les activités correspondant aux courbes 1, 2, 3 et 4 sont respectivement : 540, 600, 260, 220.

Concentration en arginase (dans 1, 2, 3, 4) : 1,35 mg/ml.

4) Variation en fonction de la concentration en métal :

Si maintenant, en conservant constantes les concentrations e et s , nous faisons varier m , nous obtenons les résultats réunis sur les figures 22 (cobalt) et 23 (nickel); la variation $\Delta d_S = d_{MPS} - d_M$ est une fonction linéaire de la

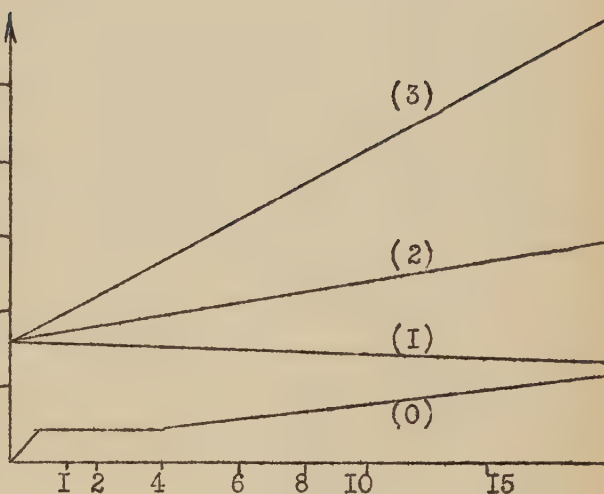
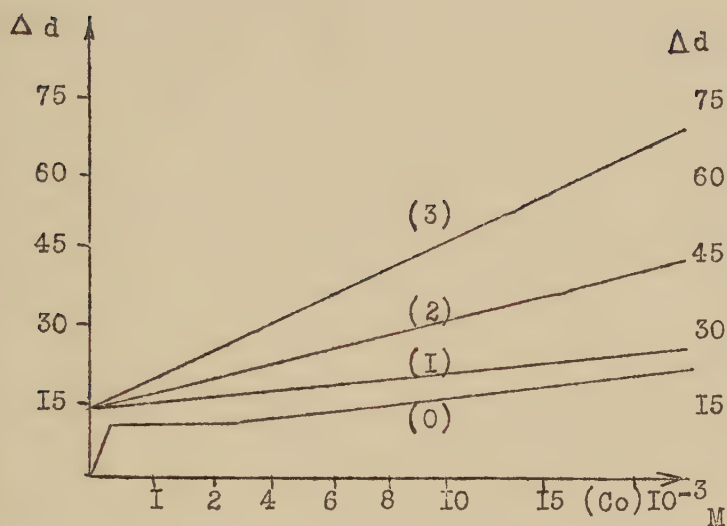


FIGURE 22

FIGURE 23

Variation Δd de la densité optique en fonction de la concentration en métal, lors de la formation du complexe apoarginase-M-arginine.

Abscisses : concentration en Cobalt (Fig: 22); en Nickel (fig.23)

Ordonnées : Δd , différence des densités optiques à 524 m μ ou 400 m μ de solution de Co ou Ni, en l'absence ou en la présence d'arginase (courbe 0)

ou d'arginase L(+)-arginine

(Courbes 1, 2, 3 : 0,95 - 2,85 - 5,7 . 10⁻² M d'arginine)

dans tous les cas on a e constante = 1,35 mg/ml d'apoarginase

concentration en métal. Nous pouvons en conclure que l'ensemble : apoarginase + substrat fixe le métal de façon continue, donc qu'il existe un complexe défini EMS. Remarquons enfin que les droites $\Delta d_s = f(m)$ correspondant à diverses concentrations en L(+)-arginine, s, se coupent en un même point de l'axe des y et que leur pente est une fonction linéaire croissante de s. Ceci va nous permettre de prévoir les limites de formation du complexe à trois constituants.

Nous avons signalé que la quantité de ce complexe formée était proportionnelle à la distance entre un point d'une courbe 0 d'une part, et un point d'une des courbes 1, 2, ou 3,

situé sur une même verticale ($\Delta d_s = d_{MPS} - d_{MP}$). Or il est aisé de voir sur la figure 22 et encore plus sur la figure 23 que cette distance pourra s'annuler dans certains cas : à ce moment, il n'y aura plus formation de complexe EMS, l'addition de L(+)arginine au complexe EM laissant celui-ci intact : remarquons que ceci ne pourra arriver qu'à $m > 4,4$ donc pour le deuxième complexe. Si l'on écrit les équations des droites ci-dessus on trouve :

	cobalt	nickel
0 (3ème partie)	$\Delta d = 0,70 m + 8$	$\Delta d = 0,70 m + 4$
1 (S) = $0,95 \cdot 10^{-2} M$	$\Delta d = 0,53 m + 13$	$\Delta d = 0,33 m + 25$
2 $2,85 \cdot 10^{-2} M$	$\Delta d = 0,98 m + 13$	$\Delta d = 1,0 m + 25$
3 $5,7 \cdot 10^{-2} M$	$\Delta d = 1,97 m + 13$	$\Delta d = 3,0 m + 25$

Dans ces équations Δd et m sont les valeurs de la différence de densité optique et de la concentration moléculaire en métal multipliées par 1.000 (calculs plus aisés). Le coefficient angulaire de ces droites est une fonction linéaire de la concentration moléculaire en substrat. Si l'on désigne en effet celle-ci, multipliée par 100, par s on trouve :

$$\begin{aligned} \text{coefficient angulaire (cobalt)} &= 0,43 s + 0,24 \\ \text{" " (nickel)} &= 0,7 s + 1 \end{aligned}$$

La concentration limite en substrat (au-dessous de laquelle il peut, à un moment, ne plus y avoir formation du complexe EMS) est celle dont la droite correspondante est parallèle à la droite 0; donc de coefficient angulaire 0,7.

$$\begin{aligned} \text{Ce sera donc pour le cobalt : } s &= 1,07 \\ \text{pour le nickel : } s &= 2,4 \end{aligned}$$

Donc des concentrations de L(+)arginine inférieures à $1,1 \cdot 10^{-2} M$ pour le cobalt et à $2,4 \cdot 10^{-2} M$ pour le nickel seront insuffisantes en présence de fortes concentrations en métal pour modifier le complexe EM.

Plus la concentration de L(+) arginine sera faible, plus faible sera la concentration de métal susceptible d'empêcher la formation du complexe EMS (sans pour cela qu'elle puisse descendre cependant au-dessous de $4,4 \cdot 10^{-3} \text{M}$).

5) Variation en fonction de la concentration en protéine :

Il nous reste à étudier, à concentration en métal et en L(+)-arginine constantes, l'effet de quantités croissantes d'apoarginase. Comme cela apparaît sur la figure N° 24, les phénomènes sont très différents selon qu'on se trouve d'un côté ou de l'autre de la concentration critique en métal $4,4 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

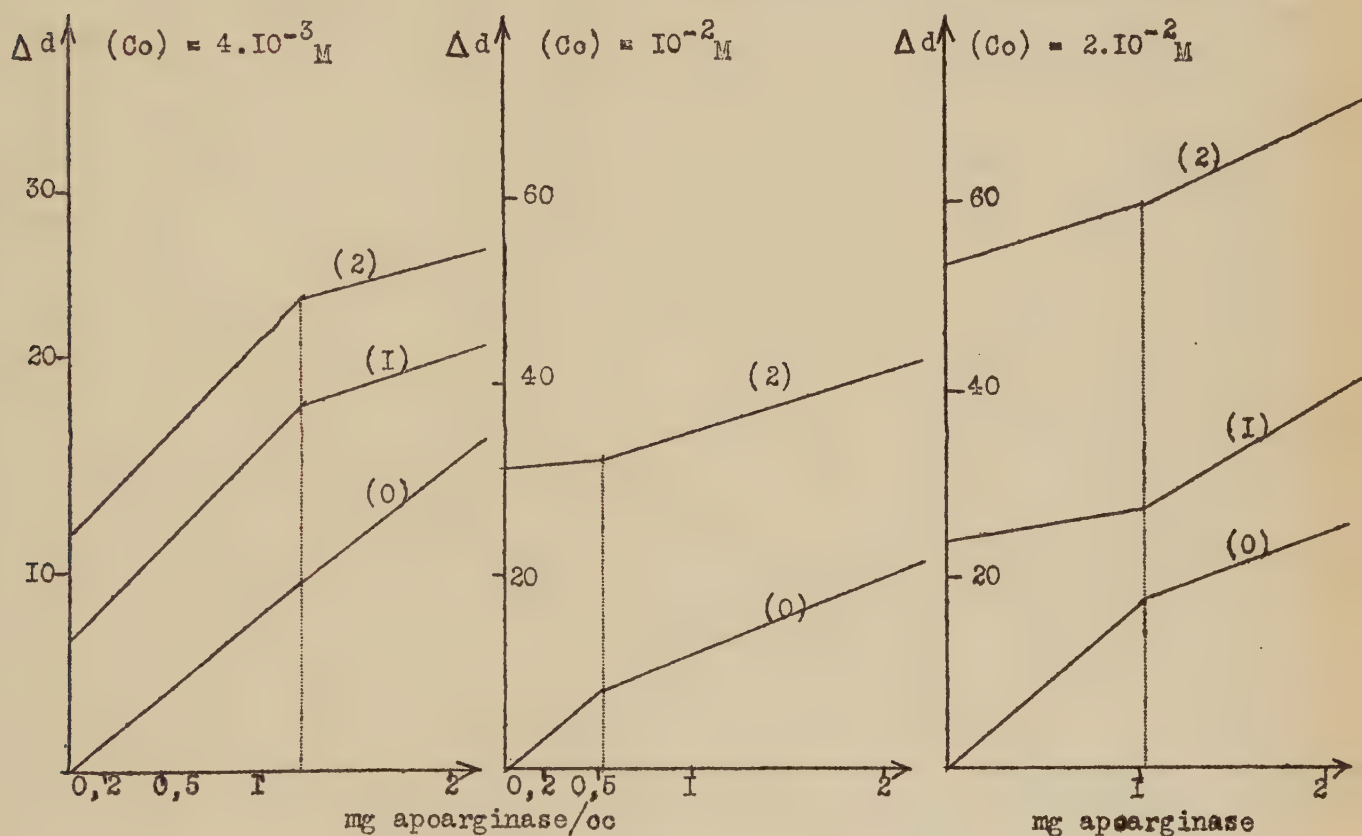


FIGURE 24 : Variations Δd de la Densité optique, en fonction de la concentration en apoarginase, lors de la formation du complexe apoarginase - Co - Arginine.

Abcisses : concentration en apoarginase

Ordonnées : Δd = différence des densités optiques à 524 m μ de solution de Co et d'arginine en l'absence ou la présence d'arginase (courbe 0), ou d'arginase + L(+) arginine (courbes 1, 2 : $2,85 - 5,7 \cdot 10^{-2} \text{M}$ d'arginine) concentration de cobalt; à gauche $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$, au centre 10^{-2}M , à droite $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$

Voyons d'abord ce qui se passe au-dessus ; toutes les courbes (qui sont encore des ensembles de droites) présentent un point anguleux correspondant au point équivalent de la courbe $\Delta d = f(e)$. Avant ce point, il n'y a en solution que le deuxième complexe $(EM)_2$; or la variation de densité optique apportée par l'addition de L(+)-arginine n'augmente que très faiblement avant ce point : c'est donc que le complexe EMS ne se forme que difficilement. Après ce point, là où commence à apparaître le premier complexe $(EM)_1$, la droite représentant l'augmentation de densité optique a une pente beaucoup plus forte, donc la formation de EMS est plus facile. Il est à noter d'ailleurs que, plus la concentration de L(+)-arginine est forte, moins la différence entre le comportement des deux complexes $(EM)_1$ et $(EM)_2$ est marquée. Il semblerait donc que le complexe $(EM)_1$, en présence d'arginine, donne toujours naissance au complexe EMS, alors qu'il faut de fortes concentrations en L(+)-arginine pour transformer $(EM)_2$ en EMS.

Si nous examinons maintenant le cas des concentrations en cobalt inférieures à $4,4 \cdot 10^{-3} M$ nous sommes toujours en présence du premier complexe $(EM)_1$. Les courbes obtenues en présence de L(+)-arginine sont formées chacune de deux droites (de même direction quelle que soit la concentration de L(+)-arginine), qui se coupent en un point toujours situé sur la même verticale. Ce point est un point équivalent de notre système E-M-S : si on le dépasse, l'apoarginase en excès n'entre plus en combinaison. Or ce point est le même pour deux concentrations différentes de L(+)-arginine. C'est donc que l'arginine à $2,85 \cdot 10^{-2} M$ est déjà en excès et que le cobalt fait défaut : ceci va nous permettre de savoir quelle est la quantité de métal qui intervient dans la formation du complexe E-M-S. On voit ici que 1,2 mg d'apoarginase, par ml correspond à une concentration de $4 \cdot 10^{-3} M$ de cobalt : donc dans le complexe EMS à 10.000 g de protéines sont fixés 33 atomes-grammes de cobalt.

B/- Discussions des résultats :

On peut tirer de cette étude les conclusions suivantes :

1) Rôle du complexe EM dans la formation du composé enzyme-substrat -

On aurait pu penser qu'un seul des éléments de ce complexe EM, l'apoarginase ou le métal, était responsable de la fixation des molécules de substrat. Nos résultats démontrent qu'il n'en est rien : le métal est en jeu puisque les propriétés optiques de la solution apoarginase-métal varient par addition d'arginine; c'est l'indice d'un remaniement électronique des molécules du métal, donc de la participation de celui-ci à la réaction. Mais, d'autre part, le métal ne peut fixer la L(+)-arginine sans l'aide de la protéine que dans un complexe très peu stable : l'hypothèse d'un métallo-substrat ne saurait donc à elle seule rendre compte des faits; ceci d'ailleurs est confirmé par le fait suivant, déjà signalé par MOHAMED et GREENBERG (161) : on ne peut obtenir d'activation ou de réactivation par une incubation préalable du métal et du substrat seuls.

Le composé apoarginase-métal est donc bien l'élément indispensable à l'action enzymatique.

2) Conditions d'action du complexe (EM)₁ :

Nous n'avons pu expliquer au chapitre précédent pourquoi l'activité de l'enzyme croît avec la concentration en métal, alors que le premier complexe (EM)₁ est déjà entièrement formé. Les résultats des essais que nous discutons montrent que le composé enzyme-substrat est relativement plus riche en cobalt que le complexe (EM)₁ : il comporte en effet 33 atomes-grammes de Co pour 10.000 g d'apoarginase, au lieu de 18. Lorsque (EM)₁ est formé, il lui faut donc un supplément de cobalt pour atteindre son activité maximum. Les courbes Δ d en fonction de la concentration en cobalt rendent d'ailleurs compte de cela : la différence $\Delta d_S = d_{MPS} - d_{MP}$ croît après le point équivalent du premier complexe. Or Δd_S est, comme nous vu, proportionnel à la quantité du composé EMS formé.

Il reste à expliquer pourquoi la partie Protéine-Métal du composé Enzyme-Substrat n'est pas directement formée par incubation du métal et de l'apoarginase. Ce résultat ne peut être en effet expliqué par le décalage, imposé par notre méthode entre le pH d'étude et le pH optimum d'activation, d'où aurait pu résulter une modification du complexe formé : mais la courbe d'activation à pH 7,5 présente exactement la même particularité (point anguleux) que la courbe correspondant à pH 9. Il faudrait donc penser qu'il y a interaction entre le cobalt et la L(+)-arginine lors de leur fixation sur la protéine. Il est possible que les 15 atomes-grammes manquant au premier complexe servent à fixer pour leur compte l'arginine, afin de faciliter ensuite son attraction par l'enzyme : on aurait ainsi un enzyme, métallo-protéine, dont le véritable substrat serait le complexe métallique de l'arginine.

3) Rôle du deuxième complexe (EM)₂ :

Nos résultats, en permettant de prévoir l'inaptitude du second complexe à fixer la L(+)-arginine, et ceci d'une façon qui s'est avérée exacte, ont pleinement justifié nos hypothèses. Mais ils nous ont aussi révélé les raisons profondes de cette inaptitude : le second complexe (ou plus probablement les second, troisième.... complexes) est beaucoup trop riche en cobalt pour attirer la L(+)-arginine : il lui faut perdre une très grande partie de ses atomes de métal pour former le composé enzyme-substrat. Il est certain que ce sont les plus lâchement fixés qui doivent partir : cependant l'énergie à dépenser pour les chasser n'est pas nulle. Ceci nous explique que la L(+)arginine, lorsqu'elle est en faible concentration, ne peut se fixer sur la surface enzymatique. Par contre à forte concentration, son affinité pour le complexe E-M est telle qu'elle déplace l'excès de cobalt, permettant ainsi à la réaction d'avoir lieu.

Nous voyons ainsi que les différences apparentes entre les actions des trois métaux Mn, Co, Ni sur la figure 6(p.36)

n'étaient dus qu'au choix de la concentration en substrat : celle-ci - $0,95.10^{-2}M$ était très inférieure à la concentration critique pour le Nickel, légèrement inférieure à celle du cobalt (ainsi Co inhibait moins rapidement que Ni) et vraisemblablement supérieure à celle du manganèse. Ce qui nous permet de ranger ces métaux dans l'ordre de stabilité de leur complexe le plus riche en métal : $Ni > Co > Mn$ ou dans l'ordre d'affinité de la L(+)arginine pour le complexe actif :



Notons enfin que, quelle que soit la concentration en substrat, il y aura toujours après la concentration de métal, seuil de la formation du deuxième complexe, diminution, si légère soit-elle, d'activité; le temps mis par le substrat pour dissocier le complexe trop chargé, si minime soit-il, augmentera cependant le temps total de la réaction, donc se traduira par une baisse d'activité (celle-ci étant d'autant plus importante que la concentration en substrat est plus faible).

On peut résumer brièvement tout ceci en disant que le métal activateur, à forte concentration, peut se comporter en inhibiteur compétitif : il se fixe en effet lui-même sur l'enzyme, en compétition avec le substrat.

4) Conclusion :

Le parallélisme observé entre les conditions de réaction et d'activité et celles de formation des différents complexes, la possibilité de prévoir l'activité d'une combinaison donnée par l'étude de ses propriétés spectrales, enfin, l'explication donnée au rôle du métal, permettent d'admettre notre hypothèse de départ sur la nature de l'enzyme et sur le rôle que joue le métal dans la formation du complexe Enzyme-substrat.

De plus, la remarque faite sur la persistance de l'augmentation de densité optique après addition de L(+)-arginine, nous a ouvert un nouveau problème: l'ornithine, produit de l'hydrolyse arginasique, est-elle susceptible de se combiner au complexe EM, ce qui expliquerait son rôle d'inhibiteur concurrent.

CHAPITRE V

ETUDE du COMPLEXE ARGINASE-METAL-INHIBITEUR

Nous avons été amené à envisager que l'un des produits de l'hydrolyse arginasique pourrait remplacer l'arginine dans le complexe EMS. On peut supposer que ce rôle revient à l'ornithine et non à l'urée, l'acide aminé semblant en effet seul susceptible de participer à un complexe métallique, à concentration relativement faible.

Or, GROSS (84) puis HUNTER et DOWNS (107) ont établi que l'arginase est inhibée par l'ornithine, en raison de l'analogie de structure que celle-ci présente avec le substrat: une compétition dont les centres actifs de l'enzyme sont l'enjeu, s'établit entre les deux corps.

Ceci n'est d'ailleurs qu'un cas particulier de l'inhibition dite compétitive, dans laquelle interviennent deux réactions :

$E + S \rightleftharpoons ES \quad (K_S) \quad \text{et} \quad E + I \rightleftharpoons EI \quad (K_I)$
 S et I étant respectivement le substrat et l'inhibiteur. L'action de celui-ci dépend de la concentration en substrat et HUNTER et DOWNS ont montré qu'on pouvait exprimer la fraction d'activité restant α par l'équation :

$$(I) \quad \frac{\alpha}{1 - \alpha} = K_I \frac{K_1}{K_S} (S)$$

Dans l'inhibition non compétitive au contraire, le degré d'inhibition de l'enzyme ne dépend que de l'enzyme et de l'inhibiteur. Ici, l'inhibiteur se fixe à l'enzyme et au complexe ES (avec une affinité égale), en un point sur lequel S

ne se combine pas à E. L'équation correspondante s'écrit :

$$(I) \quad \frac{\alpha}{1-\alpha} = K_I$$

HUNTER et DOWNS, examinant l'action des acides aminés sur l'activité de l'arginase ont constaté que deux d'entre eux seulement la lysine et l'ornithine, produisaient une inhibition compétitive; des acides mono-aminés, tels la valine, la leucine, la norvaline et l'isoleucine, produisent une inhibition non compétitive.

A) Recherches personnelles :

Nous avons poursuivi des recherches à ce sujet, dans le cadre de la formation des combinaisons ES et EI. Après incubation d'arginase en présence de cobalt, nous avons additionné des parties aliquotes de la solution du complexe EM, de solution d'arginine, de lysine, d'ornithine et de valine. Nous avons déterminé la densité optique des solutions finales et, en répétant l'expérience en présence de quantités variables de métal, obtenu les résultats réunis dans la figure N° 25.

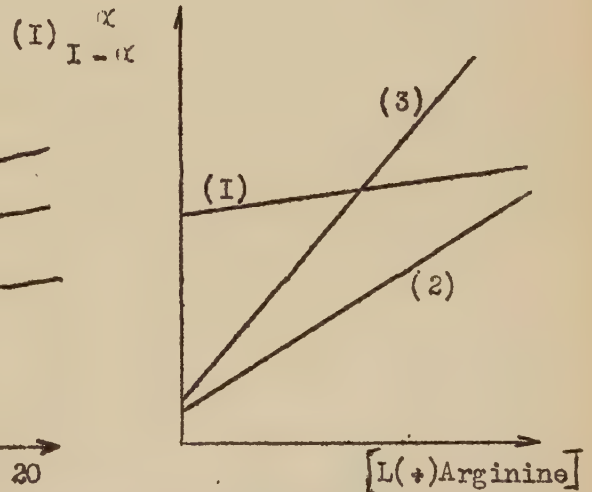
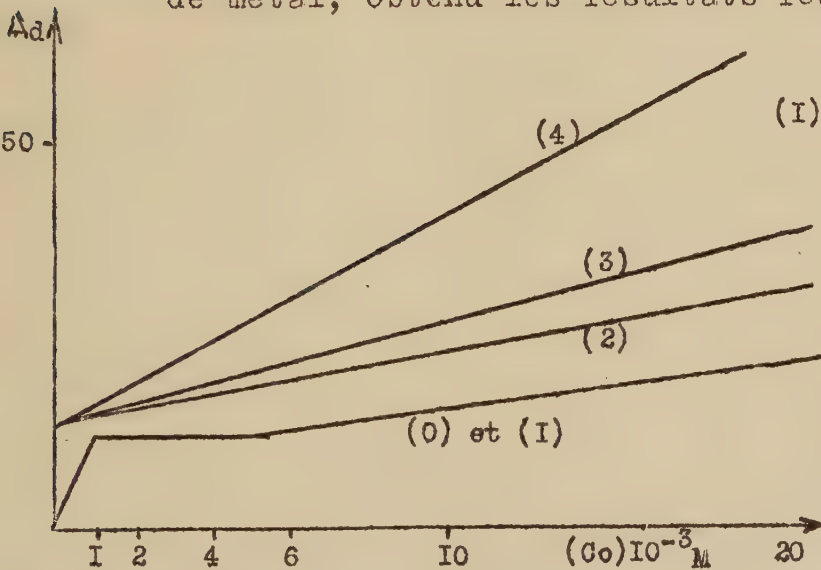


FIGURE 25: Action de l'Ornithine, de la Lysine et de la Valine comparée à celle de l'Arginine sur une solution de complexe APOARGINASE-METAL
 abscisses : concentration en cobalt
 ordonnées : $\Delta d = d_{MPA} - d_M$
 concentration en acide aminé: $5,7 \cdot 10^{-2} M$
 Pour les deux figures courbe 1 : en présence de valine; (I) $\frac{\alpha}{1-\alpha}$
 courbe 2 : " d'ornithine
 courbe 3 : " de lysine
 Courbe 0 : pas d'acide aminé
 Courbe 4 : en présence d'arginine.

Figure 26: Inhibition de l'Arginase par l'Ornithine, la Lysine et la Valine d'après HUNTER et DOWNS (107)
 abscisses; concentration en substrat ordonnées:
 rapport $(I) \frac{\alpha}{1-\alpha}$
 courbe 1 : en présence de valine;
 courbe 2 : " d'ornithine
 courbe 3 : " de lysine

Nous constatons que l'ornithine, comme nous le prévoyions, donne bien naissance à un complexe apoarginase-cobalt-ornithine. La lysine se comporte de façon semblable, alors que la valine ne semble pas se combiner au complexe EM par l'intermédiaire du métal : son addition à la solution du complexe EM ne modifie absolument pas les propriétés optiques de la solution.

Les droites de la figure 25 peuvent être représentée par leurs équations

$$(2) \quad \Delta d = 0,95 m + 13$$

$$(3) \quad \Delta d = 1,3 m + 13$$

$$(4) \quad \Delta d = 2,7 m + 13$$

Nous pouvons en déduire (puisque l'augmentation de la densité optique est due à une moins grande iorisation, donc une plus grande stabilité du complexe formé) que la stabilité des complexes formés par les acides aminés avec l'enzyme croît dans le sens :

ornithine < lysine < arginine

Notons cependant qu'aucune conclusion n'en pourrait être tirée quant au pouvoir inhibiteur des acides considérés. La figure 26 nous montre au contraire que la concentration d'acide aminé qui provoque une inhibition de 50% est plus forte, à une concentration de substrat donnée, pour la lysine que pour l'ornithine.

B/-Conclusion :

Il est possible de différencier par les expériences décrites ci-dessus les inhibiteurs de l'arginase qui, tels l'ornithine et la lysine, se combinent à l'enzyme par l'intermédiaire du métal, comme le substrat, et d'autre part ceux qui, comme la valine, s'y fixent selon une autre modalité. C'est donc bien par compétition avec l'arginine que l'ornithine et la lysine sont inhibiteurs, l'action de la valine relevant d'un autre mécanisme. Nous avons là une preuve supplémentaire du rôle du métal dans la fixation du substrat à l'enzyme.

Cependant l'absence de variation de la densité optique de la solution pendant et après l'hydrolyse de l'arginine n'est pas entièrement expliquée par l'action de l'ornithine. En effet, la figure N° 25 montre qu'à concentration en acide aminé égale, la variation de densité optique apportée par l'arginine est beaucoup plus importante que celle due à l'ornithine. Il faut donc penser que le complexe apoarginase-cobalt-ornithine qui prend naissance par transformation du complexe apoarginase-cobalt-arginine, diffère de celui qui est formé par action directe de l'ornithine sur l'enzyme.

Chapitre VI

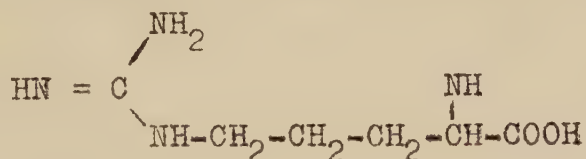
ETUDE DES COMPLEXES

APOARGINASE-METAL-SUBSTANCES VOISINES de l'ARGININE

Nous proposons de préciser quels groupements d'atomes de la molécule de substrat interviennent dans la formation du complexe enzyme-métal-substrat, nous devons d'abord résumer les données actuellement établies dans ce domaine. Nous essaierons ensuite, en étudiant l'aptitude de certaines substances voisines de l'arginine à former un complexe avec le métal du composé EM, de déterminer ceux de ces groupements qui se fixent à la molécule protéique, et ceux qui se lient au métal.

A - SPECIFICITE DE L'ARGINASE

L'arginine, substrat spécifique de l'enzyme,



est un acide α -aminé, possédant un groupement guanidique et une chaîne de 5 atomes de carbone.

1) Groupement guanidique :

Ce groupement est indispensable. Sa substitution supprime totalement l'action de l'enzyme. Ceci ressort de l'inactivité totale de l'arginase sur la δ -N-méthylarginine-THOMAS (224)-, l'arginine-phosphate -MEYERHOF (150)- et la nitro-arginine -FELIX (55)-. D'autre part, ce groupement guanidique ne doit pas être situé sur une chaîne latérale : l'arginase est, en effet, inactive sur la guanidylleucylglycine -ROCHE(183).

2) Groupement carboxyle :

Il est généralement admis que ce groupement doit être présent à l'état libre -LIEBEN (137). EDLBACHER (49) et CALVERY (28) ont montré en effet, respectivement, que ni l'ester méthylique de l'arginine, ni l'esther éthylique de l'acide arginique ne sont hydrolysés. EDLBACHER (46) a, de plus, montré que sur l'arginylarginine, on ne pouvait libérer que 50 % de l'urée qu'on pourrait attendre. D'une façon générale, lorsque l'arginine est engagée dans une liaison peptidique par son -CODH, elle n'est pas hydrolysée - (ROCHE (182)).

3) Groupement α -aminé :

Les substitutions de ce groupement inhibent à des degrés divers l'activité de l'enzyme. Ainsi l'arginase conserve-t-elle une activité modérée ou faible sur des dérivés monosubstitués (-NH-R) tels la monobenzoylarginine -FELIX (55)-, la carbamidoarginine -HUNTER (105)-, l' α -N-toluolsulfonylarginine -RICHARDS (175)-, l'octopine (dérivé α -N-propionique) -AKASI (1)-, et l'acétyl-phényl-alanylarginine -UTZINO (228)-. En revanche, l'arginase est rigoureusement inefficace sur les dérivés disubstitués (-NR₂) tels que la dibenzoylarginine -FELIX (55).

D'autre part, le remplacement d' -NH₂ par -OH n'empêche pas l'action de l'enzyme : l'acide arginique est en effet hydrolysé, bien qu'à une vitesse faible, par l'arginase -CALVERY (28), FELIX (56), HUNTER (108).

4) Chaîne reliant les groupements guanidiques et carboxyle :

La nature de cette chaîne se révèle assez peu importante -ROCHE (183)- puisqu'elle peut être carbonée (arginine, acide arginique) ou comporter soit un pont oxydique (canavanine : DAMODARAN (37) soit une liaison peptidique (guanidylglycylglycine : ROCHE (183)). Mais la longueur de la chaîne est un important facteur de la spécificité de l'enzyme. ROCHE et MOURGUE (181) (183) (184), étudiant l'activité de l'arginase sur divers dérivés guanidiques, ont montré que les dérivés dans lesquels

la chaîne reliant les groupements guanidique et carboxyle comportait plus ou moins de quatre atomes de carbone, sont totalement insensibles à l'action de l'enzyme. Ainsi l'acide arginique est-il hydrolysé, alors que son homologue inférieur, l'acide β -guanido- α -hydroxy-propionique, ne l'est pas. De même, l'homologue supérieur de l'arginine, l'acide ξ -guanido- α -amino-caproïque, que l'on a longtemps cru être hydrolysable par l'arginase -FELIX (56)- ne l'est que par un enzyme différent: l'hétéroarginase -ROCHE (184).

5) Spécificité optique :

Signalons enfin que l'arginase n'attaque pas la D(-)-arginine : REISSE (174) et EDLBACHER (45).

6) Conclusion :

L'action de l'enzyme semble donc liée à l'existence sur une molécule de groupements guanidique, carboxyle avec en α : NH_2 , NHR ou OH , les groupements guanidique et carboxyle étant séparés par quatre $-\text{CH}_2$, ou par une chaîne de longueur analogue. On peut envisager que, si le groupement guanidique se fixe sur le centre actif de l'enzyme, c'est grâce à l'orientation que donne à la molécule de substrat, la combinaison de l'extrémité de la chaîne (COOH et NH_2) à une autre partie de la molécule protéique. HELLERMAN et STOCK (94) suggèrent que c'est sur ces deux groupements que s'exerce l'attraction du métal.

De toute façon, on conçoit aisément -ROCHE (178)- la nécessité d'une longueur de chaîne donnée entre les deux centres de la molécule de substrat qui se fixent : elle correspond vraisemblablement à la distance qui sépare les deux centres d'attraction sur la molécule enzymatique.

B - RECHERCHES PERSONNELLES

Nous allons avoir recours à l'étude spectrophotométrique pour déterminer quelles molécules, voisines de l'arginine, peuvent réagir avec le cobalt fixé sur l'arginase par incubation préalable. Nous avons choisi les corps suivants :

- acide α -hydroxy- δ -guanido valérianique (acide arginique)
- acide α -amino- δ -hydroxy valérianique
- acide α -amino- ζ -guanido caproïque (homoarginine)
- acide α -amino- ξ -hydroxy caproïque

Le résultat de leur étude, ajoutés à ceux obtenus sur l'ornithine et la lysine, permettront d'élucider le rôle des divers éléments de la structure du substrat que révèle la spécificité de l'arginase. Il aurait été intéressant d'ajouter à ces corps un dérivé de l'arginine dans lequel seul le groupement COOH serait modifié, par exemple un ester. Malheureusement les esters de l'arginine ou de l'acide arginique sont très peu solubles dans l'eau.

Enfin, nous étudierons l'action de la D(-)-arginine, pour éclaircir le problème de la spécificité optique.

1) Techniques Expérimentales :

L'acide α -amino- δ -hydroxy valérianique et son homologue supérieur nous ont été fournis par Monsieur R. GAUDRY (Québec).

L'acide arginique a été préparé suivant la méthode de FELIX (56), l'homoarginine selon celle de STEVENS et BUSH (215), dont nous nous sommes également inspirés pour mettre au point une préparation de la D(-)-arginine.

a) Préparation de la D(-)-arginine :

3g de monochlorhydrate de DL-ornithine sont dissous dans 20 ml d'eau. On y ajoute 2,5g d'oxyde cuprique et on chauffe jusqu'à ébullition. La solution est refroidie puis filtrée afin d'éliminer l'excès d'oxyde. On prend d'autre part 5g de sulfate acide de O-méthyl-iso-urée- préparé à partir du picrate, WERNER(243), par la méthode de HUGHES (103) - et on le dissout dans 5 ml d'eau. On ajoute alors un peu moins d'un équivalent d'hydroxyde de Baryum, concentré et chaud (on s'arrête lorsque le pH de la solution approche 5), on centrifuge et on écarte le précipité. La solution de O-méthyl-iso-urée

ainsi obtenue est ajoutée à la solution de complexe cuprique d'ornithine; on ajuste le pH à 10,4 et on laisse 48 heures à la température ordinaire. On décompose alors le complexe cuprique d'arginine formé par passage de H_2S : SCu est éliminé par filtration sur terre d'infusoire. On porte alors la solution à pH 9, on y ajoute Cl_2Co jusqu'à une concentration de $10^{-3}M$ et enfin une quantité d'arginase suffisante. On laisse agir 24 heures à $30^\circ C$, en contrôlant la disparition d'arginine; quand celle-ci atteint une valeur limite, il reste en présence un mélange de D(-)-arginine, de DL-ornithine, avec des traces de méthyl-iso-urée et d'enzyme. On passe ce liquide sur permutite 50, qui retient l'arginine et elle seule. On lave plusieurs fois et on élue par NH_4OH , 4N : l'arginine obtenue est concentrée et recristallisée 3 fois. On a vérifié la pureté du produit par chromatographie sur papier (témoins: arginine, ornithine, mélanges des deux). Le produit obtenu comprenait au minimum 95 % d'arginine et, au maximum 5% d'ornithine. Le caractère dextrogyre de l'arginine a été vérifié au polarimètre et confirmé par la résistance absolue du produit à l'action arginasique.

b) Protocole expérimental :

On dialyse une solution d'arginase pendant 2 heures contre de l'eau permutée, avec agitation. On réactive par incubation dans le mélange suivant : 3 ml de pyrophosphate de sodium à 8%, pH 8

0,5 ml de Cl_2Co (à l'une des concentrations suivantes : 0,02 M; 0,04 M; 0,1 M; 0,2 M)

1 ml de solution d'arginase inactivée.

Après 4 heures d'incubation à $30^\circ C$, on ajoute 0,5 ml d'une solution de la substance étudiée à une concentration de 0,57 M. On laisse reposer 5 minutes et on lit la densité optique à 524 m μ au spectrophotomètre. Une autre lecture est effectuée après 12 heures, la solution étant entre temps laissée.

sée à la température ordinaire.

Dans le cas de la D(-)-arginine, on a comparé l'action du mélange obtenu à celle de l'ornithine correspondante seule : celle-ci est pratiquement nulle.

Nous avons retenu pour chaque corps, le chiffre qui caractérise son action : la pente de la droite $\Delta d = f [(M)]$ (rappelons que dans le cas de la protéine seule la pente de la droite est 0,7).

Il est d'autre part nécessaire de suivre, pour chaque corps étudié, son comportement vis à vis de l'action arginasique ; l'acide arginique est hydrolysé ; les autres corps se sont révélés inhibiteurs. Nous avons, pour ceux-ci, (et pour les trois étudiés au chapitre précédent) déterminé l'inhibition que provoque une concentration de $5,7 \cdot 10^{-2} M$ du corps étudié sur l'hydrolyse de l'arginine ; nous avons travaillé à trois concentrations initiales en arginine : $2,22 \cdot 10^{-2} M$, $4,45 \cdot 10^{-2} M$, $8,9 \cdot 10^{-2} M$. Nous avons désigné par α le rapport :

$$\alpha = \frac{\text{activité en présence du corps étudié}}{\text{activité en l'absence du corps étudié}}$$

2) Résultats :

Les résultats réunis dans le tableau IX confirment d'abord ceux du chapitre précédent : les corps étudiés sont tous, à l'exception de la valine, susceptibles de se lier au métal du complexe EM, et sont également des inhibiteurs compétitifs de l'arginase. Nous allons essayer d'interpréter les différences d'action de ces corps en fonction de leurs différences de structure, afin de déterminer quels éléments de celle du substrat interviennent particulièrement.

On peut faire les observations suivantes :

- l'arginine, l'ornithine, l'acide α -amino-hydroxy valériannique, la valine ont une extrémité de leur molécule identique :



T A B L E A U IX

Réaction, avec l'arginase, de corps voisins de l'arginine

Constitution	Corps Etudié	Réaction avec M de EM Δd	Réaction en présence d'arginase (pour les inhibiteurs :		
			α_1	α_2	α_3
$\begin{array}{c} \text{N} \\ \text{N} \end{array} \text{C} = \text{N} - (\text{CH}_2)_3 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	L-Arginine	+ 2,7	Hydrolysé		
$\begin{array}{c} \text{N} \\ \text{N} \end{array} \text{C} = \text{N} - (\text{CH}_2)_3 - \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	D-Arginine	+ 1,05	0,13	0,25	0,37
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \end{array}$	Ornithine	+ 0,95	0,28	0,37	0,48
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	α -amino δ -hydroxy valérianique	+ 0,75	0,77	0,90	1
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \text{H} \end{array} \text{C} = \text{N} - (\text{CH}_2)_4 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	homo-arginine	+ 0,8	0,51	0,63	0,73
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - (\text{CH}_2)_3 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \end{array}$	Lysine	+ 1,3	0,33	0,44	0,58
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - (\text{CH}_2)_3 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	α -amino ϵ -hydroxy caproïque	+ 0,7	0,81	0,92	1
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ (\text{CH}_2)_3 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	valine	—	0,56	0,57	0,60
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \text{HN} \end{array} \text{C} = \text{N} - (\text{CH}_2)_3 - \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Acide Arginique	+ ?	Hydrolysé		

α_1 , α_2 , α_3 , inhibitions relatives aux concentration initiales
d'arginine : $2,2 \cdot 10^{-2} \text{M}$; $4,45 \cdot 10^{-2} \text{M}$; $8,9 \cdot 10^{-2} \text{M}$, produites par une
concentration de $5,7 \cdot 10^{-2} \text{M}$ en corps étudié.

Or, leur fixation sur le cobalt de l'arginase est très différente ; donc cette partie de la molécule ne peut être à elle seule responsable de leur combinaison à l'enzyme. Il semble que celle-ci soit très nettement influencée par le caractère de l'autre extrémité de la molécule : elle est très forte pour un groupement guanidique, reste assez importante pour un groupement aminé, s'affaiblit nettement avec un groupement hydroxyle et n'existe absolument plus dans le cas d'un groupement non polaire.

- Mais l'existence de ce groupement polaire ne suffit pas à expliquer la fixation : l'acide arginique en effet est nettement moins fixé que l'arginine. Il y a donc une intervention du groupement

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array} \quad \text{très certainement}$$

par son NH_2 . Rien ne permet cependant de dire que le carboxyle n'intervient pas.

- La longueur de la chaîne reliant ces deux éléments (groupement guanidique et α -aminé) semble n'exercer aucune influence systématique ; l'arginine se fixe mieux que l'homo-arginine, mais l'ornithine moins bien que la lysine ; quant aux acides α -amino- δ -hydroxyvalérianique et α -amino- ξ -hydroxy caproïque, ils se comportent identiquement.

Mais nous savons que cette longueur de chaîne est rigoureusement spécifique pour l'activité enzymatique : c'est donc que la fixation du substrat sur l'enzyme se fait non seulement par l'intermédiaire du métal, mais aussi directement par au moins un groupement libre de la protéine. Son action s'exercerait soit sur le carboxyle soit sur l'azote terminal du groupement guanidique. La fixation au métal amène la molécule dans une certaine position vis à vis de la molécule protéique. On imagine aisément que cette position dépend de la longueur de la molécule entre les deux points d'attache au métal et il faut alors admettre que seules les chaînes à quatre atomes de carbone amènent le groupement carboxyle (ou guanidique) dans la zone d'attraction du groupement actif de

la protéine.

Notons enfin que tous les acides α -aminés sont des inhibiteurs non compétitifs de l'arginase -HUNTER et DOWNS (107)- c'est à dire qu'ils ne se fixent sur l'enzyme, qu'en des points qui ne servent pas à la fixation du substrat : on serait tenté d'en déduire que la fixation des molécules d'acide α -aminé se fait par l'intermédiaire du carboxyle terminal, seul groupement dont la fixation au cobalt n'ait pas encore été démontrée. Mais il n'en faut pas conclure que le groupement carboxyle de l'arginine ne serve pas à la fixation sur la molécule enzymatique : il serait difficile alors d'en expliquer le caractère indispensable.

Pour élucider ce point, deux hypothèses peuvent être avancées, qui d'ailleurs ne s'excluent pas l'une l'autre :

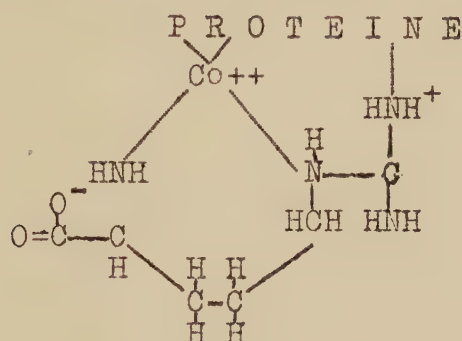
- Il est vraisemblable qu'il y a influence mutuelle entre les actions de chaque groupement du substrat et qu'il y a une relation entre l'attraction par le métal et l'attraction par la molécule enzymatique; un groupement, par exemple COOH, pourrait favoriser, sans y avoir de rôle direct, l'une de ces deux attractions. Une explication semblable permettrait de résoudre une énigme que nous avons soulignée plus haut : la présence du groupement guanidique assure à l'arginine une excellente fixation sur le cobalt; cette fixation n'est pas modifiée lors de l'hydrolyse et la fixation de l'ornithine qui en résulte semble supérieure à celle qui a lieu par action directe de l'ornithine sur l'arginase. Cette fixation a donc été favorisée par une partie du groupement (l'azote terminal) qui n'y participe pas.

- On peut, d'autre part, penser que le groupement carboxyle ne sert pas à la formation du complexe Enzyme- substrat, mais qu'il sert dans le processus d'hydrolyse; on peut citer le cas semblable du groupement carboxyle de l'acétylcholinestérase -WILSON (245)-. Mais ceci semble moins vraisemblable étant donnée la distance qui sépare ce groupement de la

liaison à hydrolyser.

CONCLUSION :

On peut donc penser à un schéma du type suivant :



dans lequel le cobalt est relié à l'azote α -aminé et à l'azote du groupement guanidique lié à la chaîne valériannique, l'un des azotes terminaux du même groupement servant de lien avec la molécule protéique. Pour utiliser entièrement les éléments de spécificité il reste à indiquer que le carboxyle

joue certainement un rôle et qu'enfin c'est l'attraction du cobalt qui amène la molécule dans une position favorable à la liaison protéine -N guanidique.

Ce schéma vaut strictement pour l'activation par le cobalt et le nickel, aucune expérience du même genre n'ayant pu être tentée avec le manganèse.

T R O I S I E M E P A R T I E

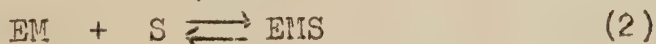
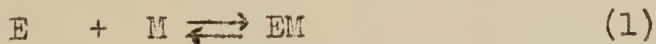
RAPPORT ENTRE LA CONSTITUTION DE L'ENZYME ET SON ACTIVITE

INTRODUCTION

La nature des groupements fonctionnels du substrat qui interviennent dans le complexe Protéine-Métal-Substrat, ayant été étudiée, nous avons cherché à définir ceux de la protéine enzymatiques auxquels est liée l'activité arginasique.

Même dans des enzymes pour lesquels un groupement prosthétique n'est pas indispensable, certaines régions de la molécule participent seules à l'activité. Le groupement actif est constitué par un ensemble d'atomes susceptible d'activer le substrat; mais d'autres groupements de l'enzyme, en quelque sorte adaptés à une partie du substrat, permettent la fixation de celui-ci sur la molécule enzymatique et, de ce fait, l'action catalytique.

Considérant que l'action enzymatique peut se résumer par les équations suivantes :



on peut envisager l'existence sur la protéine de groupements responsables :

- 1°) de la fixation du métal sur la protéine
- 2°) de la fixation du substrat sur le complexe enzymatique
- 3°) de l'activation de S avec rupture du complexe EMS et libération des produits d'hydrolyse.

Les groupements libres de la molécule protéique peuvent provenir des acides aminés terminaux ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$) ou des chaînes latérales des acides aminés engagés dans les chaînes peptidiques ($-\text{SH}$, -Phénol...). La méthode d'étude de ces groupements consiste à les modifier au moyen de réactifs chimiques appropriés et à rechercher les variations apportées par les diverses modifications aux réactions (1), (2) et (3).

Nous suivrons les réactions (1) et (2) par nos méthodes spectrophotométriques et l'ensemble des trois par l'étude de l'activité enzymatique.

OLCOTT et FRAENKEL-CONRAT (167) définissent ainsi les conditions que l'on doit respecter pour s'assurer de la spécificité d'une réaction :

- 1 - la quantité de réactif introduit doit être mesurable
- 2 - le nombre de groupements de la protéine ayant réagi doit être mesurable.
- 3 - La quantité de réactif utilisé et le nombre de groupements ayant réagi doivent être équivalents.
- 4 - La réaction doit se faire dans des conditions douces et être, si possible, réversible.

Il conviendra en outre, de rejeter les réactions dont les conditions provoqueraient un changement total de la configuration naturelle de la protéine (hydrolyse, dénaturation).

Dans ces conditions (qui ne sont que rarement réunies), si l'activité biologique d'une protéine purifiée est perdue puis, après réversion de la réaction, regagnée, le groupement mis en cause peut être considéré comme jouant un rôle positif dans l'activité biologique. Le principe de notre étude ainsi posé, il nous reste à voir les difficultés que

l'on peut attendre de sa réalisation. Celles-ci viendront d'abord de la complexité des réactions :

- en principe même : si nous considérons la réaction (I) et que nous introduisons un corps susceptible de réagir avec l'apoenzyme , il faudra toujours songer qu'il peut également réagir avec le métal (par formation de complexe, par exemple, si fréquente de la part de Co ou Ni). On pourrait ainsi arriver à une inhibition par élimination du métal , la présence du réactif favorisant le déplacement de l'équilibre (I) de la droite vers la gauche.

- en pratique: l'impureté de nos préparations enzymatiques va être le principal écueil de notre étude. Elle limitera la signification de nos résultats puisqu'en effet nous ne pourrions nous livrer aux contrôles recommandés ci-dessus (ils ne peuvent rien nous apprendre puisque nous ne savons pas si les groupements visés appartiennent à l'arginase ou aux protéines qui l'accompagnent). De plus, ces protéines peuvent protéger l'enzyme contre le réactif (leur action serait semblable à celle d'antiinhibiteurs naturels) ou, par suite, de leur modification sous l'action du réactif, devenir aptes à réagir avec le métal.

Nous pensons cependant pouvoir venir à bout de ces difficultés grâce aux précautions suivantes : nous utiliserons d'abord, dans l'étude de chaque groupement, plusieurs réactifs aussi différents que possible, dont nous vérifierons la susceptibilité de former un complexe avec le métal. Nous répèterons enfin ces expériences à divers stades de la purification de l'enzyme afin de préciser le rôle des impuretés dans les résultats obtenus.

Une confrontation générale des résultats doit pouvoir nous donner une idée assez nette des conséquences qu'a le blocage ou le remplacement du groupe étudié.

Il nous restera alors les difficultés d'interprétation;

nous avons admis que l'inactivation de l'enzyme par blocage d'un groupement ou d'un type de groupements prouvait le caractère essentiel de celui ou de ceux-ci. Or la nature même du groupement peut n'être pas en cause : ainsi l'insuline est inactivée par l'estérification de ses groupements COOH ; il semble que ce ne soit pas le blocage du groupement qui soit responsable de cette inactivation mais bien la variation de la charge de la protéine.

Il peut enfin se faire que la formation d'un dérivé sur un groupement non essentiel puisse avoir une influence, défavorable sur l'activité d'un groupement voisin essentiel : on peut avoir par exemple un effet stérique qui empêche la substrat d'atteindre le centre actif. Ces réserves faites, nous nous proposons de rechercher le rôle des groupements thiol, disulfide, aminé, carboxyle et phénol - les plus accessibles et les plus souvent importants - dans l'action enzymatique de l'arginase.

Chapitre I

ROLE DES GROUPEMENTS SULFHYDRYLES

A/- Réactifs connus des groupements -SH :

Les groupements -SH libres des protéines proviennent de la cystéine. Ils sont doués d'une extrême réactivité -OLCOTT et FRAENKEL-CONRAT (167). Nous ne citerons que les réactifs réputés spécifiques.

1) Oxydants doux :

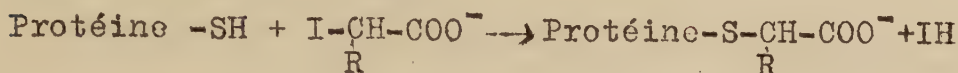
L'oxydation d'une protéine se traduit par la formation d'une liaison disulfide entre les deux atomes de soufre de deux groupements SH; elle dépend donc de la structure spatiale de la protéine puisqu'il est nécessaire d'avoir deux SH proches pour former une liaison SS. C'est ce qui rend souvent incomplet le blocage des groupements SH par les oxydants. On peut employer :

- l'iode à pH acide (3 à 5) : le plus actif -ANSON (5) (6)
- la cystine ou le glutathion oxydé en excès : la réaction,

$$2 \text{ protéine-SH} + \text{R-SS-R} \rightleftharpoons \text{Protéine} \begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{array} \text{ ou Protéine-SS-Protéine} + 2 \text{ RSH}$$
est douce et réversible.
- des oxydants tels la porphyrindine, l'iodobenzoate, ou le ferricyanure -ANSON (4) (6) (7)- : ce dernier est stable et réagit très rapidement, mais sa spécificité est moins stricte (possibilité d'oxydation de la tyrosine -MIRSKY et ANSON (155) et il peut ne pas réagir (son action dépend de la réactivité des -SH.

2) Agents d'alkylation :

L'iodoacétate et l'iodoacétamide, en milieu neutre ou légèrement alcalin, réagissent selon l'équation : -RAPKINE (173) et DICKENS (40),



Cette réaction manque généralement de réversibilité (cependant la glyoxalase inactivée ainsi regagne son activité par addition de glutathion réduit) et parfois de spécificité (possibilité d'une seconde réaction très lente avec les groupements NH_2 : ROSNER (187)). Elle peut enfin ne pas avoir lieu MAVER (147) et ANSON (8).

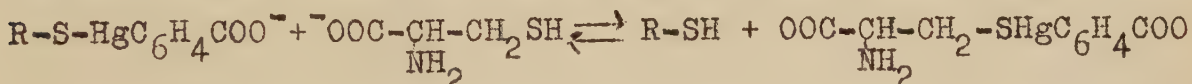
3) Composés susceptibles de former des mercaptides :

Ce sont des composés organométalliques (p-chloromercuribenzoate, nitrate phényl-mercurique) ou des arsenicaux trivalents.

Le -p-chloromercuribenzoate, employé pour la première fois par HELLERMAN (88) (89), réagit très rapidement à pH 7 suivant :



la réversion pouvant se faire par la cystéine suivant :



Ce réactif peut s'employer à faible concentration (grande affinité), est très spécifique et réagit même avec les -SH isolés ou masqués. Les arsenicaux trivalents ont les mêmes avantages; on peut avoir recours à des arsenoxydes organiques -BERSIN (18), GORDON et QUASTEL -64) (65)- ou bien à de simples dérivés minéraux -BARRON et SINGER (15), ROCHE (186)-. Cependant avec les dérivés de l'oxyde arsénieux, la possibilité d'une réduction des liaisons SS n'est pas exclue -OLCOTT (167)

B/- Recherches personnelles :

Nous avons choisi les réactifs suivants :

- Deux oxydants doux : cystine, ferricyanure de potassium
- Un agent d'alkylation : iodoacétate
- Deux formateurs de mercaptides : p-chloromercuribenzoate, arsenite de sodium.

1) Techniques expérimentales :

Selon que l'on a voulu étudier l'action du réactif lors de l'hydrolyse ou de la réactivation, on l'a ajouté après ou avant la formation du complexe enzymatique E-M. Les expériences ont été menées comme de simples déterminations d'activité (voir page 118), le réactif étudié étant alors compris dans le terme "effecteurs".

Dans le premier cas, on fait incuber l'enzyme actif en présence du réactif pendant le temps voulu. On porte ensuite le volume voulu du mélange dans la solution de substrat.

Dans le second cas, l'enzyme inactivé est mis en incubation pendant le même temps en présence du réactif. On ajoute ensuite le cation activateur et on laisse l'incubation se poursuivre quatre heures à 30°. On porte alors le volume voulu du mélange en présence du substrat. Voici les temps et les pH d'incubation que, d'après les auteurs cités plus haut et d'après nos propres observations, nous avons adoptés :

Ferricyanure	20 minutes	pH : 6,8
Iodoacétate	2 heures	pH : 7,3
p-chloromercuribenzoate	15 minutes	pH : 7,0
arsénite	1 heure	pH : 7,4

Les déterminations d'activité ont été effectuées à pH 7,2 en présence de cobalt; à pH 9,5 en présence de manganèse.

2) Etude de l'activité arginasique en présence de réactifs des groupements SH :

a) en fonction de la nature et de la concentration du réactif.

Signalons d'abord que la solubilité de la cystine est très faible : 0,01 g dans 100 ml d'eau, ce qui correspond

à une concentration molaire de $4 \cdot 10^{-4}$. Or, si l'on veut avoir une transformation significative des -SH, il faut un excès de cystine. Nous n'avons donc pu employer ce réactif.

En revanche, les autres réactifs nous ont tous donné des résultats nets d'inhibition. Nous avons fait varier les concentrations de réactifs dans de très larges intervalles (ferricyanure : de $7 \cdot 10^{-6} \text{M}$ à $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$; iodoacétate : de $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ à $8 \cdot 10^{-2} \text{M}$; p-chloromercuribenzoate : de $1,8 \cdot 10^{-5} \text{M}$ à $3,6 \cdot 10^{-3} \text{M}$; arsénite : de $1,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$ à $1,8 \cdot 10^{-4} \text{M}$). Les résultats ont été réunis sur la figure n° 27.

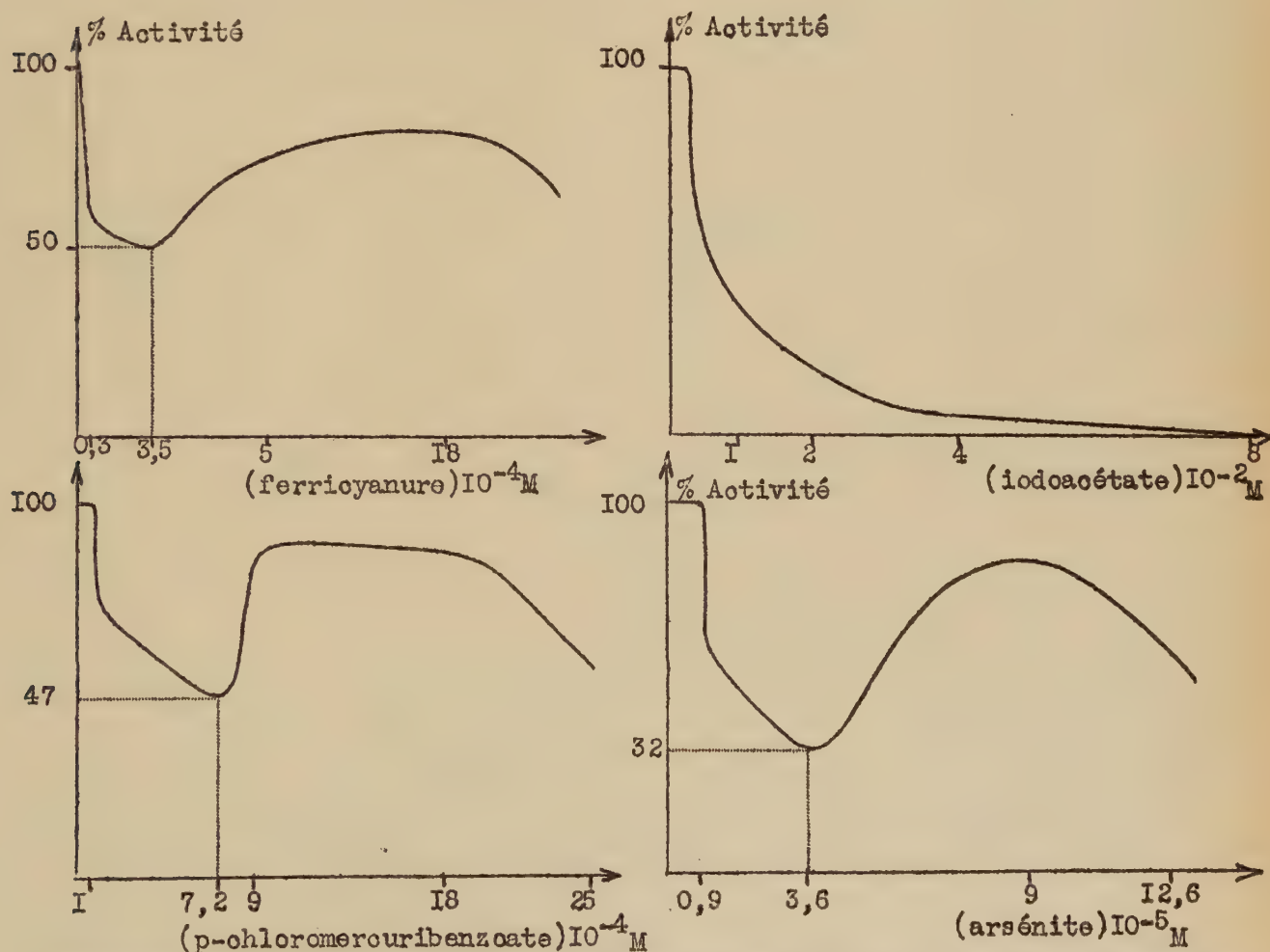


FIGURE 27 : Influence des réactifs spécifiques des groupements -SH sur l'action de l'arginase.

abscisses : concentration en réactif
ordonnées : pourcentage d'activité restant en présence de réactif.

b) en fonction de la nature du métal activateur :

Nous sommes partis d'une solution enzymatique inactivée par dialyse. Deux parties en ont été réactivées séparément par incubation de quatre heures à 30° : l'une en présence de cobalt ($4,35 \cdot 10^{-3} M$) dans un tampon au véronal à pH 7,5; l'autre en présence de manganèse ($8 \cdot 10^{-4} M$) dans un tampon au véronal à pH 9.0 (la concentration finale en protéine restant la même de part et d'autre). On a alors déterminé l'action de l'arsénite et de l'iodoacétate sur l'activité arginasique des deux solutions enzymatiques obtenues. Les résultats en sont présentés sur la figure n° 28.

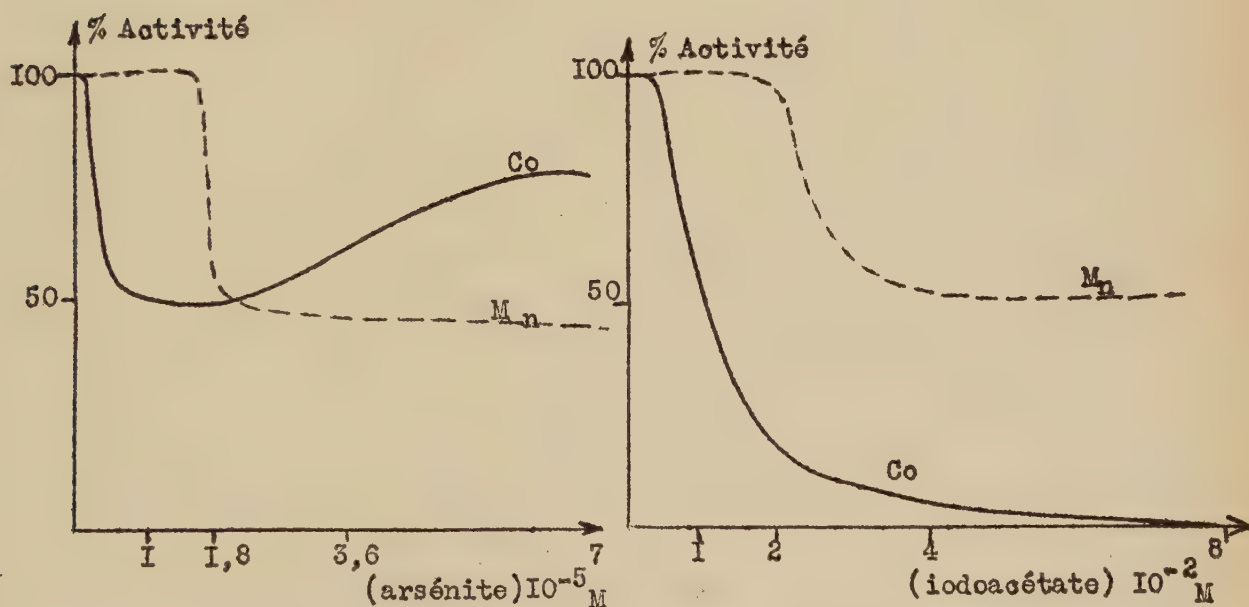


FIGURE 28 : Influence de l'iodoacétate et de l'arsénite sur l'action arginasique des complexes apoarginase-cobalt et apoarginase-manganèse.

abscisses : concentration en inhibiteur
 ordonnées : pourcentage d'activité restant en solution
 tracé continu : enzyme activé par le cobalt
 tracé discontinu : enzyme activé par le manganèse
 à gauche : action de l'arsénite
 à droite : action de l'iodoacétate.

c) en fonction de l'état de pureté et d'activation de l'enzyme.

Nous avons d'abord étudié l'action de l'arsénite sur deux préparations enzymatiques : l'une titrant 4.500 U.P., l'autre 2.000. Les conditions d'expériences sont les mêmes et c'est le pourcentage d'activité initiale que l'on considère: figure n° 29.

Enfin, une solution enzymatique inactivée a été réactivée d'une part en présence de cobalt à la concentration $4.10^{-3}M$, d'autre part, en présence de cobalt à la concentration $2.10^{-2}M$. Le pourcentage d'activité en présence d'arsénite a été porté sur la figure n° 30.

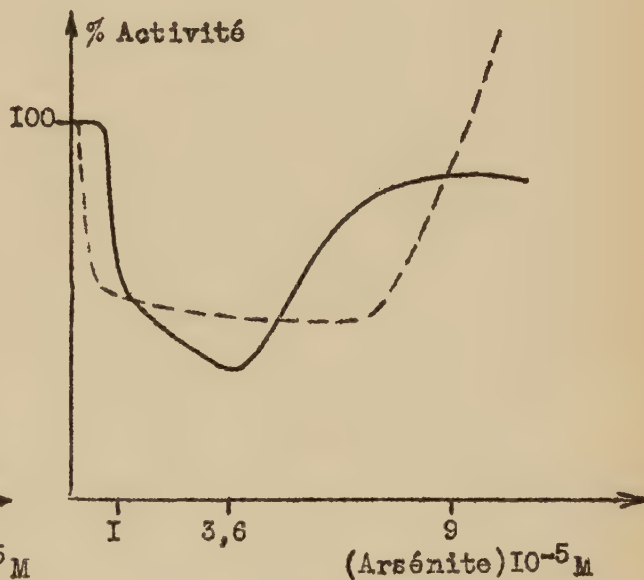
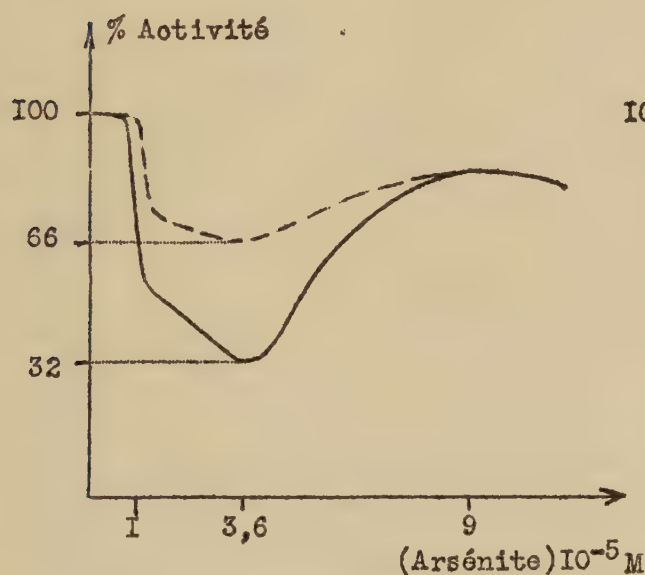


FIGURE 29 : Influence de la pureté de l'enzyme sur la réaction arsenite-arginase.

trait continu: enzyme titrant 4.500 U.P.
trait discontinu: enzyme titrant 2.000 U.P.

abscisses : concentration en arsenite

ordonnées: pourcentage d'activité restant en présence d'arsénite.

FIGURE 30 : Influence de l'activité de l'enzyme sur la réaction arsenite-arginase.

trait continu : enzyme réactivé par le cobalt à $4.10^{-3}M$
trait discontinu: enzyme réactivé par le cobalt à $2.10^{-2}M$.

3) Etude de la réactivation d'un enzyme inactivé dont les groupements SH ont été bloqués :

a) Réactivation :

Une solution enzymatique inactivée par dialyse a été soumise, une heure à 20°C, à l'action de l'arsénite à pH 7,4 en l'absence de métaux. Au bout de ce temps, on a ajouté du cobalt à la solution et on l'a laissée incuber 4 heures à 30°C. On a alors déterminé l'activité arginasique et on l'a rapportée à celle obtenue avec la même quantité de métal lorsque l'arsénite est remplacée par de l'eau dans l'incubation préalable.

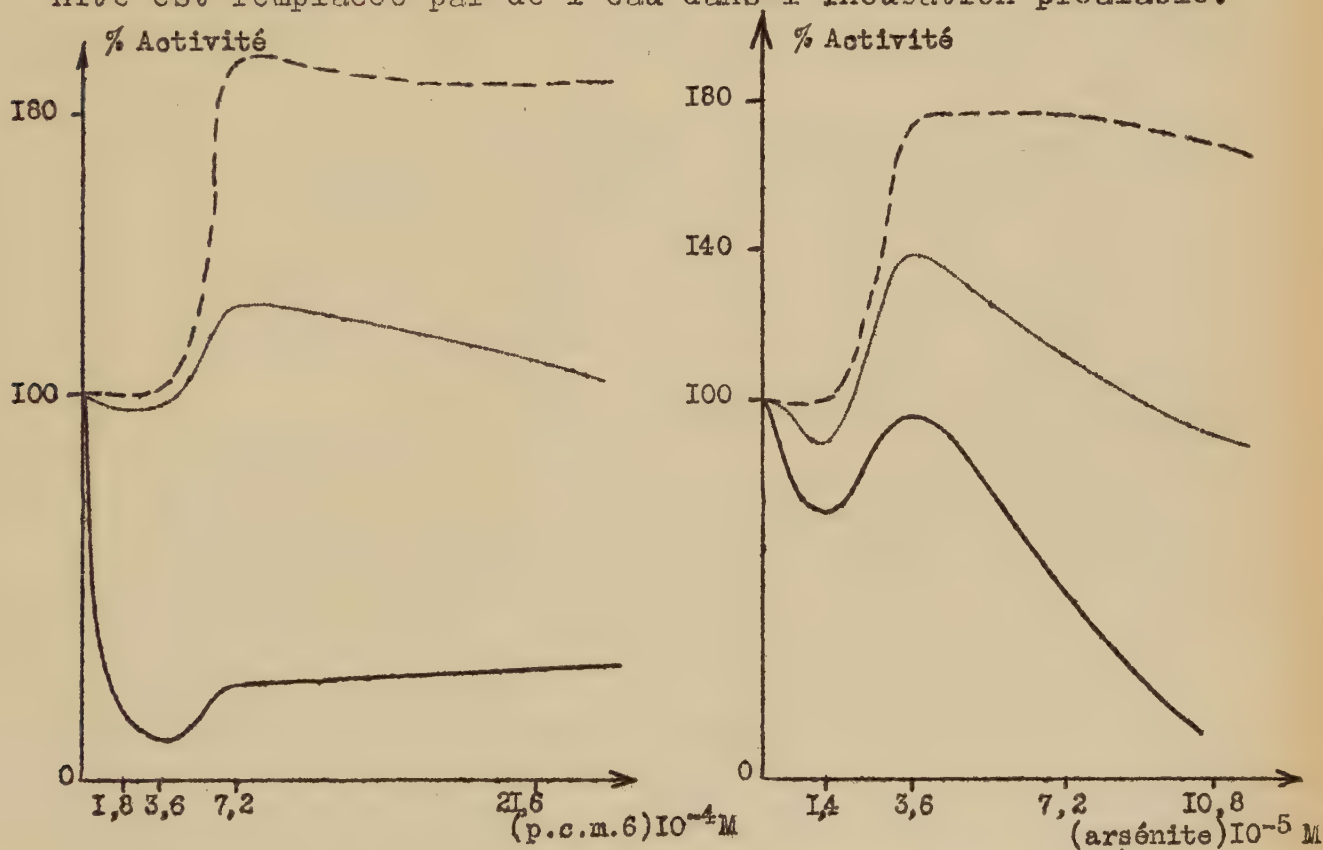


FIGURE 31 : Action des réactifs spécifiques des SH sur la réactivation de l'arginase par le cobalt.

scisses : concentration du réactif

données : pourcentage d'activité

ait continu : enzyme réactivé par (Co) : $2.10^{-3} M$

ait pointillé : enzyme réactivé par (Co) : $5.10^{-3} M$

ait discontinu : enzyme réactivé par (Co) : $2.10^{-2} M$

gauche : p-chloromercuribenzoate à droite : arsénite

C'est ce pourcentage d'activité que nous avons porté sur les courbes de la figure N° 31.

b) Fixation du métal :

Comme dans l'expérience précédente on a opéré la réaction apoarginase + arsénite avant de réactiver par le métal; mais au lieu de déterminer l'activité de la solution obtenue, on a étudié sa densité optique au spectrophotomètre. Nous ne citerons que les résultats obtenus à faible concentration de métal et de réactif, des phénomènes secondaires (formation de complexe métal-réactif) intervenant au delà et rendant toute interprétation impossible. Les résultats obtenus à des concentrations inférieures à celle indiquée ont la même signification.

Tableau X : Action des réactifs des Groupements SH sur la fixation de cobalt sur l'apoarginase.

Teneur de la solution en	Protéine	0	0	0	p	p	p	p	p
	Arsénite	0	10	0	0	2	10	0	0
	p.c.m.b.	0	0	2	0	0	0	0	2
d.optique de la solution		31	31	31	38	33	31	31	31
Teneur des solutions en Cobalt: $4.10^{-3}M$; p 0,4 mg/ml									
Teneur en arsénite exprimées en $10^{-5}M$									
Teneur en p. c.m.b. exprimées en $10^{-3}M$									

4) Réversion des réactions de blocage des SH :

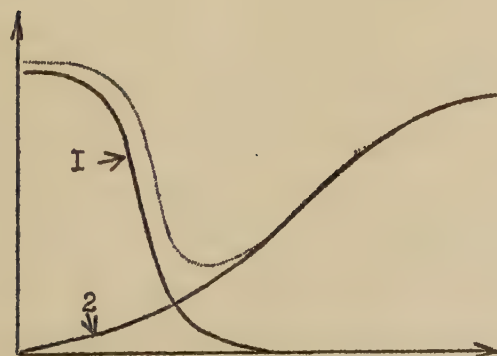
Nous n'avons pu l'étudier car la cystéine, que l'on emploie généralement pour l'obtenir, est douée d'une grande affinité pour le cobalt : la réversion ne pourrait qu'être masquée par un phénomène secondaire dû à la formation d'un complexe cystéine-cobalt.

Nous avons envisagé un moment d'étudier l'action de la lewisite sur les groupements SH, action qui est réversible par le B.A.L. -BARRON-(14). Mais le B.A.L. a par lui-même une action inhibitrice sur les métallo-enzymes -WEBB (239)-

C/- Discussion des résultats :

Notons d'abord la différence d'action de nos réactifs : seul l'iodoacétate se comporte comme un inhibiteur usuel ; au contraire les trois réactifs qui agissent avec une grande similitude, frappent par l'allure inhabituelle de leurs courbes d'inhibition : la réaction $E + I \rightleftharpoons EI$ étant régie par la loi d'action de masse, on a $a - \frac{a-x}{x} = KI^N$ si a est la concentration totale en enzyme, x la quantité d'enzyme actif (donc $a-x$ la quantité d'enzyme lié à l'inhibition), I la concentration en inhibiteur, N le nombre de molécules d'inhibiteur combiné à un groupement de l'enzyme. Donc la courbe représentant l'activité restante (ou x) en fonction de $\log I$ est une courbe en S, telle que celle que présente l'iodoacétate. Or, si nous avons bien un départ usuel d'inhibition (à partir de $3 \cdot 10^{-5}M$ pour le ferricyanure, $1 \cdot 10^{-4}M$ pour le p-chloromercuribenzoate et $9 \cdot 10^{-6}M$ pour l'arsénite), les courbes s'infléchissent très vite et au delà d'une certaine concentration en réactif (respectivement $3,5 \cdot 10^{-4}M$; $7,2 \cdot 10^{-4}M$; $3,6 \cdot 10^{-5}M$) une addition de réactif entraîne une diminution de l'inhibition, puis plus loin encore un retour à l'inhibition. Il semble bien qu'il y ait là superposition de deux phénomènes inverses : nous montrons sur la figure 32 qu'une courbe telle que celle de la figure 27 peut être considérée comme représentant la somme de deux fonctions (les valeurs de N sont prises uniquement comme exemples).

FIGURE 32 : Explication de la forme des courbes de la figure 27.



abscisses : $\log I$
ordonnées : x

$$\text{courbe 1 : } x_1 = \frac{a}{I + KI^4}$$

$$\text{courbe 2 : } x_2 = \frac{aI}{I + K}$$

$$\text{courbe en pointillés : } x = x_1 + x_2$$

La première (courbe 1 sur la figure) représente une

courbe d'inhibition normale ; la seconde une courbe d'antiinhibition.

On peut donc penser que nos réactifs ont deux actions sur l'arginase : une inhibition, qui prédomine à faible concentration en réactif, l'autre d'antiinhibition qui prédomine à forte concentration.

Si nous examinons maintenant ce qui se passe avec un enzyme activé par le manganèse, trois remarques s'imposent : la réaction commence seulement à 1.10^{-5} en arsénite ou 2.10^{-2} M eniodoacétate, alors qu'elle est déjà terminée pour le même enzyme activé par le cobalt. Ensuite, il n'y a pas de deuxième réaction dans le cas de l'arsénite et enfin on n'atteint que 50% d'inhibition avec Mn au lieu de 100% avec Co.

Qu'en peut-on déduire ? la première observation semble indiquer qu'il y a moins de groupements SH libres dans la molécule d'enzyme activée par le cobalt que dans la même molécule activée par le manganèse. Il faut que le cobalt soit fixé sur des groupements SH (qui eux ne sont pas indispensables à l'activité puisque leur blocage, dans les cas de l'apoarginase-Mn, n'abaisse pas l'activité).

La deuxième observation va nous fournir une hypothèse sur la nature de l'antiinhibition : supposons que le centre actif de l'enzyme comprenne plusieurs groupements SH. La réactivation de l'enzyme par le cobalt consiste en la fixation de cobalt sur certains de ces groupements. Si l'on fait agir un des réactifs, il commence par bloquer les groupements restés libres et qui sont essentiels à l'activité de l'enzyme : inhibition, qui est maxima lorsque tous les SH non porteurs de cobalt sont bloqués par le réactif. Mais nous devons noter que nos réactifs ne sont pas sans action sur le cobalt : ils sont susceptibles de former avec lui un complexe, donc de l'attirer hors de l'enzyme lorsque leur concentration est importante. A ce moment, le cobalt libère un groupement SH qui peut servir à l'activité (il ne peut être bloqué par le réactif qui est lié au cobalt). Seul

un excès de réactif amènera à nouveau l'inhibition. Toutes ces réactions secondaires n'existeraient pas dans le cas du manganèse, puisqu'alors il n'y aurait pas de manganèse fixé sur des SH. Ceci est d'autant vraisemblable que le seul réactif à ne pas donner un tel phénomène est le seul à être pratiquement sans action sur le métal : l'iodoacétate.

La troisième observation enfin nous montre que dans le cas d'un enzyme activé par le manganèse les groupements SH gardent leur importance (leur blocage provoque une nette inhibition) mais cependant ne sont pas seuls à assurer l'activité enzymatique puisque cette inhibition ne peut dépasser 50% , au contraire de celle d'un enzyme activé par le cobalt qui atteint 100 %.

Nos hypothèses vont-elles nous permettre d'expliquer les courbes de réactivation après traitement de l'enzyme inactif?

Les courbes correspondant à un défaut de cobalt (incubation à $2.10^{-3}M$) montrent bien que la fixation du cobalt se fait sur les groupements SH : le blocage de ces groupements ne permet de retrouver que 10 à 15 % de l'activité. Lorsqu'au contraire on emploie un excès de cobalt, le blocage des SH perd de son efficacité; la forte concentration du métal va permettre en effet la formation d'un complexe métal-réactif qui aura deux avantages : le réactif, neutralisé, n'agira pas donc n'inhibera pas; bien plus, une partie du métal (qui est en excès, rappelons le) étant liée par le réactif, la protéine sera beaucoup moins chargée en métal donc l'activation réalisée sera meilleure. C'est bien ce que traduisent les courbes de la figure 31 et les chiffres de la page 105 : ceux-ci montrent en effet :

- qu'à faibles concentrations nos réactifs ne forment pas de complexe avec le cobalt; qu'à fortes concentrations le complexe se forme.

- qu'une faible concentration de réactif gêne nettement la formation du premier complexe apoarginase-cobalt.

D/- Conclusion :

Deux faits semblent établis par cette étude dans le cas d'un enzyme activé par le cobalt.

- certains SH servent à la fixation du cobalt dans la formation du premier complexe apoarginase-cobalt.
- d'autres SH servent à l'action enzymatique, vraisemblablement à la formation du complexe enzyme-substrat.

Ces deux faits expliquent fort bien l'inhibition qui peut se produire par excès de cobalt lors de la réactivation : le métal se fixe alors, non plus seulement sur ses points d'attache réservés, mais également sur les SH réservés à la fixation du substrat.

Le fait que des SH servent à la fixation du cobalt sur la molécule protéique ne saurait surprendre : les travaux de SCHUBERT seul (198), ou avec MICHAELIS (151) (153) ont montré en effet la grande affinité du cobalt pour les groupements SH de la cystéine. Ils ont même noté que c'est entre pH 7 et pH 8 que s'opère le mieux la formation du complexe : or c'est justement la zone que nous avons trouvée (page 37) être la meilleure pour la réactivation de l'arginase par le cobalt.

Dans le cas d'un enzyme activé par le manganèse il est vraisemblable que le métal est fixé par d'autres groupements que les SH; ceci expliquerait d'ailleurs que ces groupements perdent dans ce cas leur caractère essentiel : l'activité pourrait subsister, bien que réduite, après leur blocage, la fixation du substrat pouvant être partiellement réalisée par le métal.

On ne saurait être surpris par l'importance du rôle des groupements SH dans un enzyme : sans rappeler les très nombreux exemples de ce rôle essentiel, nous signalerons que pour un autre enzyme à groupement métallique dissociable, la carboxylase, le caractère essentiel de ces groupements a été établi - STOPPANI (217).

Il peut enfin être intéressant de noter que plus l'enzyme est pur, plus ses groupements sont sensibles à l'action de leur réactif (peut-être sont-ils à l'état naturel protégés par des éléments qui disparaissent au cours de la purification). De toute façon c'est sans doute à ce fait et aussi à la complexité des réactions qu'on doit l'abondance de contradictions dans les premières études sur cette question (page 14).

Chapitre II

ROLE DES LIAISONS DISULFIDES

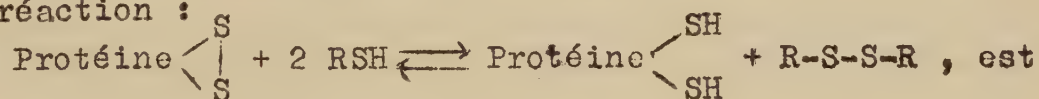
A/- Réactifs connus des groupements SS :

Les liaisons S-S des protéines, qui jouent parfois le rôle fort important de pont entre deux chaînes peptidiques, appartiennent à la cystine. Leur réactivité est assez faible, puisqu'elles ne sont touchées que par des réactions de réduction.

1) Réducteurs proprement dits :

Sauf dans le cas d'une protéine dénaturée, on ne connaît aucun autre groupement protéique susceptible d'être réduit. Les réactifs utilisés, en dehors de l'hydrogène naissant (insuline : FREUDENBERG (63)), que l'on ne peut faire agir que sur une protéine stable en milieu très acide, sont des composés thiols : cystéine, glutathion, thioglycolate.

Leur réaction :



douce et réversible, mais nécessite un excès de réactif. Les pH neutre ou faiblement alcalin sont les plus favorables -HOPKINS (99). Il faut noter que l'étendue et la vitesse de la réaction varient beaucoup suivant la protéine, et que certaines, très riches en cystine (insuline) sont très sensibles à de faibles quantités de réactif -MILLER (154). L'interprétation des résultats doit tenir compte de ce que tous les enzymes pour lesquels les groupements -SH sont essentiels sont activés par de faibles concentration en réducteurs.

2) Sulfite et cyanure :

Bien que ces réactifs aient souvent été considérés comme de simples agents de réduction, CLARK (33) a montré que la réaction du sulfite sur les liaisons SS pouvait se traduire par :



MAUTHNER (146) et WALKER (235) ont, de leur côté, montré que la réaction du cyanure sur les liaisons SS donnait naissance à un groupement SH et à un groupement thiocyanate. Ces groupements artificiels ne semblent pas intervenir dans les réactions enzymatiques -BERSIN (19), GREENBERG (79), WINNICK (246)-. Ces réactions sont douces, réversibles, et spécifiques ; elles nécessitent un pH neutre et une concentration élevée en réactif.

3) Hydrolyse en milieu alcalin :

Remarquons enfin qu'en milieu alcalin les liaisons SS sont facilement hydrolysées : c'est le cas, dès pH 9, de la sérum-albumine et de l'insuline -BARBU (13). La sensibilité d'une protéine à des pH élevés peut donc suggérer que les liaisons SS jouent un rôle essentiel dans la structure ou l'activité de cette protéine.

B/- Recherches personnelles :

Nous avons étudié l'action, sur les liaisons S-S de l'arginase, de la cystéine, du cyanure de potassium, et du sulfite de sodium. Toutes ces réactions sont lentes et favorisées par un pH très légèrement alcalin. Aussi avons-nous étudié, en fonction du temps, l'activité d'un mélange d'incubation réalisé ainsi : 2 ml de tampon au véronal, pH 8,0 ; 0,5 ml de réactif ; 0,5 ml de solution enzymatique.

Au temps choisi on prélève 0,6 ml de ce mélange qu'on met à réagir dans un tube à essai où ont été préalablement mis : 2 ml de tampon au pyrophosphate de sodium (8%) à pH 9,0 ; 0,2 ml de solution d'arginine à 4,135 g pour 100 ml.

La mesure d'activité est poursuivie normalement.

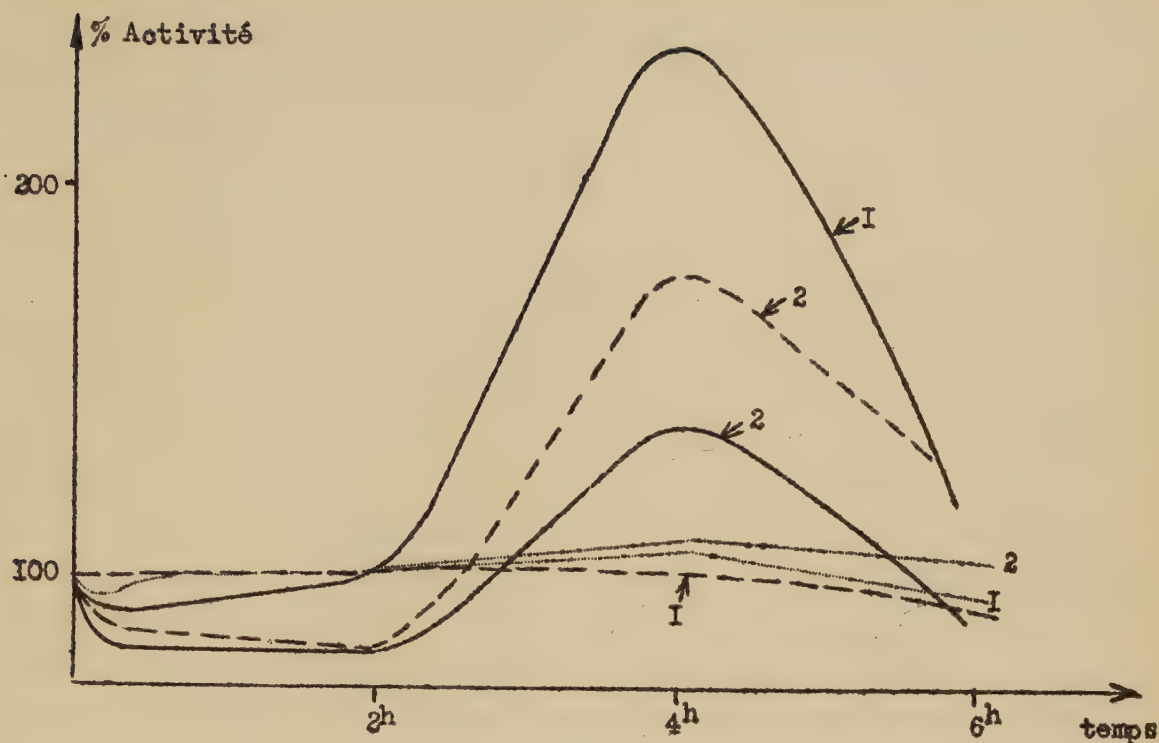


FIGURE 33 : Action de la cystéine, du cyanure et du sulfite sur l'action de l'arginase.

abscisses : temps de réaction.

ordonnées : activité résultante

trait continu : cystéine (1:0,017M; 2:0,083M)

trait discontinu : sulfite (1:0,017M; 2:0,17M)

trait pointillé : cyanure (1:0,017M; 2:0,17M)

Les concentrations de réactifs employées sont très fortes, de $10^{-2}M$ à $10^{-1}M$, conformément aux indications des auteurs qui les ont utilisés. Les résultats de nos expériences ont été rassemblés sur la figure n° 33.

C/- Discussion des résultats :

Ici encore la réaction est plus complexe qu'on aurait pu l'attendre; il semble qu'on puisse la décomposer ainsi, pour les trois réactifs :

- une réaction très rapide (terminée en quinze minutes) qui aboutit à une légère inhibition (l'activité ne tombe cependant pas au-dessous de 80% de sa valeur initiale).

- une réaction lente qui atteint son maximum au bout de quatre heures et qui se traduit au contraire par une très nette activation (gain d'activité allant jusqu'à 140% de l'activité initiale).

- une réaction commence alors qui tend à faire disparaître l'activation obtenue.

Il faut séparer la première de ces réactions : elle est rapide et est favorisée par un excès de réactif et surtout de cystéine; elle n'est due qu'à la formation d'un complexe entre le réactif et une partie du métal de l'enzyme d'où résulte évidemment une inactivation : celle-ci étant faible malgré l'excès de cystéine et malgré l'affinité bien connue du cobalt pour la cystéine - SCHUBERT (98) - nous en pouvons déduire que celle-ci est très inférieure à l'affinité du cobalt pour la protéine : or nous avons vu que le cobalt se fixait sur la protéine par l'intermédiaire des groupements SH. Donc ceux-ci ne sont pas les seules responsables de la fixation du cobalt : une autre partie de la molécule protéique y a aussi son rôle.

La deuxième réaction, au contraire, est bien la réaction d'équilibre que nous recherchions ; la transformation des liaisons SS avec apparition de groupements SH. Comme on pouvait s'y attendre d'après les résultats du chapitre précédent, celle-ci se traduit par une augmentation de l'activité; nous avons donc là une confirmation du rôle des groupements SH dans l'activité de l'enzyme.

La dernière réaction peut s'expliquer si l'on se rappelle l'importance des liaisons SS dans la structure de nombre de protéines : on risque d'aboutir par leur rupture en trop grand nombre à une dislocation de la molécule protéique donc à la perte de ses propriétés et en particulier de son activité enzymatique. Mais ce n'est évidemment là qu'une hypothèse, favorisée cependant par le fait que l'arginase est très sensible à l'alcalinité du milieu (au delà de pH 8,5 elle perd sa stabilité); ce qui suggère également que les liaisons SS sont essentielles à la structure de l'enzyme.

Si nous comparons maintenant l'action respective de chaque réactif, nous notons d'importantes différences :

- Le cyanure n'entraîne jamais, quelle que soit sa concentration, d'importantes variations d'activité (pas plus de 10%)
- Le sulfite s'il est efficace l'est cependant moins que la cystéine.

Etant donné le mode d'action différent de ces réactifs, il est permis de penser que c'est la proximité de deux groupements SH qui est particulièrement favorable à l'activité (cas de la cystéine). Quant à l'inefficacité du cyanure elle peut résulter d'une faible réactivité des liaisons SS de l'arginase ou de l'action néfaste du groupement thiocyanate artificiellement introduit.

Notons enfin que si, contrairement au sulfite, la cystéine en grand excès est moins activatrice c'est uniquement à cause de sa grande affinité pour le cobalt.

En conclusion, il est permis de penser que, si les liaisons SS participent à la structure de l'enzyme, elles sont sans influence sur l'action enzymatique.

Chapitre III

ROLE DES GROUPEMENTS AMINES

A/- Réactifs des Groupements $-NH_2$:

Les $-NH_2$ libres des protéines sont soit les groupements NH_2 de la lysine (ce sont les plus nombreux), soit les groupements NH_2 des acides aminés terminaux (extrémité des chaînes peptidiques). Ils réagissent avec de très nombreux corps et les réactifs le plus couramment utilisés dans leur étude sont malheureusement dépourvus de spécificité. Le cétène, l'acide nitreux, l'isocyanate de phényl, la formaldéhyde, le dinitrofluorobenzène, la ninhydrine réagissent de façon certaine sur les groupements NH_2 , mais il existe toujours des réactions secondaires. Il est possible cependant de tirer un enseignement de ces réactions en les confrontant avec les réactions spécifiques que nous verrons plus loin : aussi avons-nous utilisé la plus douce d'entre elles, c'est à dire la réaction de la formaldéhyde.

Cette réaction est en général fort complexe : FRENCH et EDSALL (62). Cependant, en solution neutre, elle se résume en général à une combinaison immédiate avec les $-NH_2$ libres, donnant des dérivés de la forme :

Protéine $-NH-CH_2OH$ et Protéine $-N \begin{array}{l} CH_2OH \\ CH_2OH \end{array}$: LEVY (135)

ou

Protéine $-N=CH_2$: SPRUNG (213)

La réaction est réversible par dilution, dialyse ou par action du dimédon ; si la réaction est prolongée, la liaison

devient plus forte, LOISELIER (138), la réversibilité n'étant plus possible que par dialyse acide-ROSS (188). Il faut noter enfin qu'à la température ordinaire se superpose à cette réaction une réaction très lente sur les groupements guanidiques: FRAENKEL-CONRAT (61).

Les seules réactions réellement spécifiques sont les suivantes :

1) Acétylation par l'anhydride acétique :

Cette réaction était utilisée autrefois dans des solvants tels que la quinoline ou la pyridine, - HUGHES (102) a trouvé que l'anhydride acétique est suffisamment soluble dans l'eau et ne s'hydrolyse que lentement ce qui permet la réaction avec les protéines. Cette acétylation ne semble pas causer de dénaturation et lorsque elle est pratiquée suivant la technique de OLCOTT et FRAENKEL-CONRAT (167) décrite ci-dessous, elle ne touche aucun autre groupement.

2) Benzoylation

Effectuée par le chlorure de benzoyle, cette réaction peut être spécifique à condition d'employer une quantité très limitée de réactif: MELLON (149). Sinon elle peut toucher également les groupements hydroxyles et amides : BLATHERWICK (24).

3) Guanidylation

Cette réaction semble devoir être la plus spécifique de toutes celles qui mettent en jeu les $-NH_2$. Elle consiste à remplacer ces groupements $-NH_2$ par des groupements $-N-C(=NH)-NH_2$.

Il semble improbable que d'autres groupements puissent ainsi être touchés.

On peut opérer par action de O-méthyl-iso-urée: COHN (34) puis HUGHES (103) ont employé avec succès sur la sérum-albumine la méthode mise au point par GREENSTEIN (80) et (81) sur les acides aminés et peptides.

La S-méthyl-isothiourée agit de façon semblable et elle a donné de bons résultats à SCHUTTE (199), à CHRISTENSEN

(32) et à ROCHE et MOURGUE (181). Son seul inconvénient est le dégagement de mercaptans tout le long de la réaction : aussi doit-on pour obtenir des résultats significatifs éliminer ceux-ci ensuite par dialyse.

B/- Recherches personnelles

Notre choix s'est fixé en définitive sur les trois réactions spécifiques et sur l'action de la formaldéhyde.

1) Techniques expérimentales :

a) Guaniâylation :

Une solution de 2 ml de O-méthyl-iso-urée est préparée à partir de 0,5 g de sulfate acide selon une méthode déjà décrite. On y ajoute 1 g de protéine enzymatique dissous dans 10 ml de tampon au pyrophosphate de sodium (8%) à pH 9,5. On laisse trois jours à 0°.

Un tampon est constitué de façon semblable en remplaçant le réactif par de l'eau.

b) Benzoylation :

On part de 1 g de protéine dissous dans 25 ml de tampon au pyrophosphate de sodium (8%) à pH 9,0. On refroidit la solution et en la maintenant dans un bac -3° on ajoute très lentement, avec agitation constante, à 1 ml d'une solution de 5 ml de chlorure de benzoyle dans 95 ml d'acétone. Le pH ne descend pas au-dessous de 8,5 pendant l'opération. On laisse en contact pendant deux heures.

Un témoin est traité parallèlement par 1 ml d'acétone pur.

c) Acétylation :

On part de 1g de protéine dissous dans 25 ml de solution d'acétate de sodium à demi saturation. On refroidit la solution et en la maintenant à 3° on ajoute, goutte à goutte, avec agitation constante 1,2 cc d'anhydride acétique. On laisse en contact une demi-heure.

d) Action de la formaldéhyde :

La présence de formaldéhyde lors de l'hydrolyse bloque

toute action arginasique : cela est dû vraisemblablement à la réaction de la formaldéhyde sur l'arginine (blocage du NH_2 essentiel). Nous devons donc éliminer la formaldéhyde en excès, donc prolonger son action de façon à la rendre irréversible.

On part donc de 100 mg de protéine dissous dans 20 ml de tampon au véronal 0,1M à pH 7 ; on ajoute 2 ml d'aldéhyde formique à 30%. On laisse une heure en contact puis on dialyse à pH neutre contre deux litres d'une solution de chlorure de cobalt à concentration 10^{-3}M ; la dialyse tournante est poursuivie pendant quatre heures, avec changement de solution de dialyse toutes les heures.

Un témoin, non traité, est dialysé de la même façon.

2) Résultats :

On a déterminé, après chaque traitement, l'activité arginasique d'une prise d'essai de la solution de réaction et du témoin. On a opéré dans les conditions usuelles, en dosant l'urée produite.

Les résultats ont été rassemblés dans le tableau XI.

Tableau N° XI

Activité de Solution arginasique avant ou après le blocage de leurs groupements aminés libres

	Guanidylation	Benzoylation	Acétylation	+ Formol
Sol. initiale	42000 U.A.	20000	20000	8500
Sol. témoin	22000	19500		6200
Sol. traitée	21500	18500	19500	6500
On indique le nombre d'unités arginasiques contenues dans une même prise d'essai.				

C/ Discussion des Résultats -

On peut en déduire que l'intégrité des groupements aminés de la molécule protéique n'est pas indispensable à l'activité de l'enzyme : en effet la benzoylation et l'acétylation

laissent intacte l'activité (perte inférieure à 6%). Si la guanidylolation et l'action du formol amènent des pertes sensibles apparemment, c'est en raison des conditions de la réaction (guanidylolation : trois jours à pH 9,5) ou de notre technique expérimentale (action du formol suivie d'une longue dialyse). Dans ces deux cas le témoin a une activité sensiblement égale à celle de la solution traitée.

On peut donc conclure que les groupements aminés de l'arginase n'ont pas un rôle essentiel dans le mécanisme de l'action enzymatique. Il est intéressant de noter que dans un enzyme du même groupe, la phosphatase alcaline, BACCARI (9), ROCHE et ABUL FADL (179) puis enfin ANAGNOSTOPOULOS (2) ont tous démontré le caractère essentiel de ces groupements.

Il faut enfin ajouter que les réactions utilisées s'opèrent dans des conditions relativement sévères, en sorte que nous n'avons pu les appliquer à l'enzyme privé de métal : nous ne pouvons donc pas dire si ces groupements aminés ont un rôle dans la fixation du métal sur la molécule protéique.

Chapitre IV

ROLE DES AUTRES GROUPEMENTS

La spécificité des réactions est un privilège presque exclusif des trois précédents groupements. Aussi devons-nous nous borner à une étude plus sommaire des deux derniers qui nous retiendront : groupement carboxyle et groupement phénol. Nous étudions ces deux cas en raison de leur importance, mais il est évident que nous devons nous attendre à des résultats moins significatifs.

A) Groupements -COOH

Ces groupements, qui appartiennent soit à l'acide aspartique (en δ) soit à l'acide glutamique (en ϵ) soit enfin aux acides aminés terminaux, peuvent réagir par estérification.

La meilleure méthode, la seule qui ait une chance d'être spécifique, a été décrite par FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT (60). Elle consiste à faire agir, dans du méthanol, de l'acide chlorhydrique à concentration 0,1N sur la protéine. La seule condition est que la protéine ne se dénature pas par ce traitement : ce qui ne saurait être le cas de l'arginase.

Toutes les autres méthodes font intervenir d'autres groupements en particulier phénol, SH, -OH, aminés, guanidiques.. Nous étudierons cependant de façon assez précise ce que l'on peut penser de l'action de l'ypérite (sulfate d'éthyle dichloré : $S(CH_2CH_2Cl)_2$) car c'est le seul réactif qui nous a semblé susceptible de nous donner une information sur les -COOH de l'arginase.

Alors que l'on croyait jusque là que l'ypérite agissait sur les protéines (de la peau ou du sang) par réaction avec les seuls groupements SH, PETERS (169) démontra que dans la réaction kératine-ypérite, un quart seulement de l'ypérite fixée était liée sur des SH. PIRIE (170) suggéra que la combinaison dans la réaction ypérite-collagène aurait lieu par l'intermédiaire des COOH et peut être des NH_2 . C'est la conclusion également de MOORE, STEIN, et FRUTON (162) qui ont travaillé sur les acides aminés et les peptides, et de BANKS et WORMALL (12), la part des NH_2 étant d'après eux très faible. DAVIS (38) et HERRIOT (96) ont même indiqué qu'en opérant à pH 6,0 la réaction était suffisamment spécifique des groupements COOH. Nous essaierons donc dans ces conditions ce réactif, en nous rappelant toutefois que d'autres auteurs sont favorables à l'hypothèse-SH : HARTWELL (86). Peut-être cette variété de résultats peut-elle être expliquée par l'idée de CORI (35) selon laquelle seules les impuretés qui accompagnent occasionnellement l'ypérite réagissent avec les SH.

B) Groupements phénol

Ces groupements, qui proviennent de la tyrosine, peuvent être attaqués par des agents d'acylation, des oxydants en excès, l'acide nitreux mais de façon non spécifique (toujours après d'autres groupements qui réagissent plus vite).

On peut également les transformer par nitration par le tétra-nitrométhane : WORMALL (249) mais cette réaction a lieu dans des conditions que ne pourrait supporter notre enzyme. Aussi ferons-nous usage seulement des deux réactions suivantes :

a) Action de l'iode :

En solution neutre ou alcaline, on a une réaction de substitution qui conduit à une ioduration du groupement tyrosyl en position ortho; cette réaction est favorisée par une faible concentration d'iode et un pH alcalin : LI (136).

Elle est cependant souvent difficile à séparer de la réaction d'oxydation que l'iode opère sur les groupements SH.

b) Action de la tyrosinase :

Cet enzyme, attaquerait les groupements phénol de certaines protéines : SIZER (201) a signalé en effet une oxydation marquée des groupements phénol de certaines protéines (chymotrypsine, caséine) par cet enzyme ; il ajoutait alors que la tyrosinase était sans effet sur les enzymes (pepsine, trypsine), que l'oxydation obtenue était insuffisante pour les inactiver (alors qu'ils le sont par une oxydation par voie chimique). Mais il a depuis (202) indiqué l'inactivation de l'invertase, de la pepsine, de la trypsine et d'autres protéines biologiquement actives. Aussi essaierons-nous l'action de la tyrosinase, en notant cependant que d'autres auteurs : EDMAN (51) et KAUSCHE (III) mettent en doute les résultats de SIZER et que celui-ci précise bien que la réaction dépend des groupements voisins de la protéine (85).

c) Autres groupements :

Nous terminerons en faisant agir sur l'arginase la formaldéhyde à pH II. A ce pH en effet, les groupements guanidiques, indole, étamide réagissent, en plus des groupements aminés. Ceci nous permettra de juger sommairement de l'action de l'ensemble de ces groupes.

d/- Recherches personnelles :

1°) Action de l'ypérite sur l'activité arginasique :

L'ypérite est très peu soluble dans l'eau et la solution est très instable. Aussi doit-on l'employer de préférence dans un solvant organique : de préférence au propanol qu'emploie DIXON (42), nous avons utilisé l'acétone qui, à basse température et à faible concentration ne dénature pas notre enzyme. Nous avons donc dissous 5 g d'ypérite dans 50 ml d'acétone. L'enzyme de son côté est dissous dans un tampon à l'acétate de sodium (0,04M) à pH 6,0. On prend alors 2 ml de la solution enzymatique, on la refroidit et on y ajoute, goutte à goutte, avec une agitation constante 0,5 ml de solution d'ypérite. On laisse trente minutes en contact puis on prélève 0,6 ml du mélange dont on

détermine aussitôt l'activité. Un plus long temps de contact n'est pas recommandé, car d'après DIXON la concentration d'ypérite dans la solution prend très rapidement sa valeur maximum ($2,5 \cdot 10^{-3}M$) puis tombe à 0 en vingt minutes par suite des réactions avec l'eau, les sels, l'enzyme. Si dans ces conditions l'enzyme est inactivé c'est que l'affinité de l'ypérite pour ses centres actifs est grande.

Résultats -

On a traité séparément deux solutions enzymatiques, l'une activée par le cobalt, l'autre par le manganèse et ensuite une solution enzymatique inactivée qu'après traitement par l'ypérite on a divisée en deux parts qui ont été mises à incuber, l'une en présence de cobalt, l'autre en présence de manganèse. On a obtenu les résultats suivants (exprimés en pourcentage de l'activité initiale) :

Enzyme actif (Co), traité	85 %
Enzyme actif (Mn), traité	71 %
Enzyme inactif, traité, puis réactivé Co	80 %
Enzyme inactif, traité, puis réactivé Mn	15 %

On a donc deux phénomènes différents : l'un affecte, légèrement, l'activité de l'enzyme. Comme nous savons l'enzyme sensible aux réactifs bloquant les groupements SH nous pouvons penser que l'ypérite a agi légèrement sur ces groupements, amenant ainsi cette perte d'activité.

L'autre ne touche, et là très fortement, que la réactivation de l'enzyme par le manganèse.

Il semble donc qu'on puisse avancer que le manganèse se fixe sur la protéine par l'intermédiaire des groupements carboxyle : bien que nous manquions de faits pour l'affirmer, cette hypothèse est renforcée par les arguments suivants :

- même si la réaction de l'ypérite sur la protéine n'est pas spécifique, il n'y a que les groupements -SH, en dehors des carboxyles, qui risquent de réagir notablement. Or l'étude des groupements SH ne nous a pas montré que le manganèse

s'y fixait, encore moins qu'il y avait une très grande différence entre l'activation, par le manganèse ou le cobalt d'une protéine dont les SH étaient bloqués.

- SCHMIDT qui a étudié longuement l'action du manganèse sur les protéines signale (197) que celle-ci est due en général plus spécialement à la formation d'un complexe entre le manganèse et les acides dicarboxyliques, qui s'opère dans les meilleures conditions à pH 9. Or c'est ce pH 9 que nous avons trouvé (page 37) comme pH optimum de la réactivation de l'arginase par le manganèse. L'hypothèse n'est pas, d'autre part incompatible avec ce que l'on sait de l'enzyme : la molécule protéique doit être relativement riche en groupements carboxyles libres puisque son point iso-électrique est nettement acide (de l'ordre de 4,0).

Signalons enfin que DIXON (42) et l'école de Cambridge -VAN HEYNINGEN (97) - ont étudié trente quatre enzymes. Sur ce nombre quatre seulement étaient sensibles à l'ypérite : l'hexokinase -CORI (35)- et d'autres phosphokinases -DIXON (41)-, la pyrophosphatase, la pepsine -NORTHROP (165) et des peptidases -BERGMANN (16). Il est intéressant de noter que sur ces quatre enzymes, trois sont des enzymes à constituant métallique dissociable. On peut penser que les groupements carboxyles et sulfhydryles ont fréquemment un rôle important dans de tels enzymes.

2°) Réaction sur les groupements phénoliques :

Même en solution alcaline l'iode oxyde les groupements SH; aussi ne peut-on considérer comme significatif (au point de vue rôle des groupements phénoliques) le fait signalé déjà par HELLERMAN (91) et retrouvé par nous, que l'iode supprime radicalement l'activité de l'arginase. Nous avons fait en effet agir sur notre enzyme, dans un tampon au carbonate de sodium à pH 7,4, de l'iode en poudre et laissé incubé 6 heures à la température ordinaire. Or, si minime que soit la quantité d'iode ajoutée, en une demi-heure l'activité arginasique a disparu. Nous en pouvons conclure que c'est par oxydation des

groupements SH qu'agit l'iode car les réactions d'ioduration par substitution sont beaucoup plus lentes. Cependant, il faut noter qu'ici l'inhibition est pratiquement totale (90%) : ceci doit tenir à la grande réactivité de l'iode comme oxydant, mais on ne peut affirmer la non participation des groupements phénoliques.

Nous avons d'autre part fait agir sur notre enzyme, de la tyrosinase (de pomme de terre) à pH 7,2. Même au bout de 24 heures d'action, il n'y a pas la plus légère perte d'activité arginasique. De cela non plus on ne peut tirer aucune conclusion l'efficacité de la tyrosinase sur les protéines n'étant pas démontrée et, de toute façon, étant sûrement très variable.

3°) Autres Réactions :

Nous avons enfin mis à incuber notre enzyme en présence de formaldéhyde 1M pendant dix minutes à la température ordinaire, à pH 11. Nous l'avons ensuite dialysé à pH neutre contre une solution de chlorure de cobalt à concentration $10^{-3}M$ et ceci pendant quatre heures, avec de fréquents changements de solutions de dialyse.

Après ce traitement l'activité arginasique a totalement disparu. (alors que le même traitement à pH 7 était à peu près sans effet). Il y a donc eu là une réaction qui a endommagé l'un des centres actifs de l'enzyme, ou sa structure. Nous ne pouvons cependant rien préciser, l'action de la formaldéhyde sur les protéines étant à ce pH, particulièrement complexe -FRAENKEL-CONRAT (59)-.

4) Conclusion :

En dehors du rôle éventuel des groupements carboxyles, dans la fixation de Mn, on ne peut tirer de ces données aucune conclusion sûre.

Nous ne pouvons donc pas savoir si les groupements autres que SH, SS, COOH et NH_2 ont une influence sur l'activité enzymatique ou sur la fixation des métaux sur l'enzyme.

CONCLUSIONS GENERALES

Les hypothèses généralement admises jusqu'ici sur le mécanisme des enzymes à métal expérimentalement interchangeable méritent d'être discutées dans le cas de l'arginase

I/- Mécanisme d'action de l'arginase :

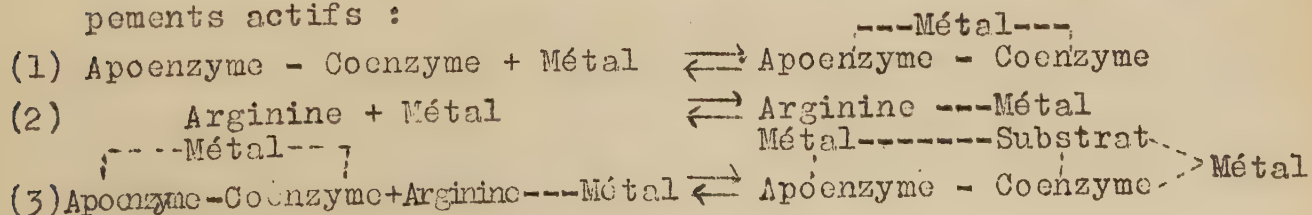
L'enzyme actif contient un métal fixé sur la molécule protéique par des liaisons de co-ordination, les métaux activateurs étant tous susceptibles de former des complexes stables.

Le véritable substrat semble être d'autre part le complexe Arginine-Métal; c'est du moins ce composé qui favorise le mieux l'attraction du substrat par le métal.

Lorsque l'on met en présence l'enzyme actif et le métallo-substrat (conditions les plus favorables à l'action enzymatique), le substrat peut être fixé à la molécule enzymatique par les trois forces suivantes :

- (A) Attraction de la molécule de substrat par le métal de l'enzyme.
- (B) Attraction du métal de substrat par un groupement actif de l'enzyme.
- (C) Attraction de la molécule du substrat par un groupement actif de l'enzyme.

On peut donc schématiser la fixation du substrat sur l'enzyme par les réactions suivantes, si nous désignons par coenzyme la partie de la molécule protéique qui porte les groupements actifs :

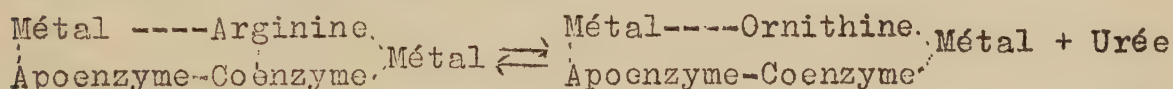


Si une molécule est susceptible d'être attirée par les forces (A) et (B) seulement, c'est un inhibiteur : on a formation d'un composé (3') :

Métal ----- Inhibiteur
Apoenzyme - Coenzyme ----- Métal, dans lequel le coenzyme n'est pas lié directement à l'inhibiteur et qui est inactif. C'est ce composé au contraire qui empêche l'arginine d'atteindre l'enzyme, réalisant ainsi une inhibition compétitive.

La liaison essentielle pour la réaction enzymatique, c'est à dire pour l'hydrolyse de l'arginine, c'est la liaison directe Coenzyme - Substrat : mais elle ne s'établit que lorsque le métal présente bien le substrat devant le coenzyme.

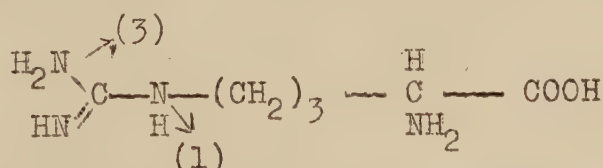
Lorsque la molécule de substrat est engagée dans le complexe formé à la réaction (3), les liaisons auxquelles elle est soumise entraînent un remaniement électronique dans sa partie sensible, la liaison guanidique, qui disparaît, la réaction pouvant se schématiser ainsi :



L'ornithine reste bien fixée à l'enzyme, inhibant ainsi la réaction : seul un excès d'arginine pourra l'en dégager.

II/- Précision dans le cas de l'activité en présence de Cobalt :

La molécule de substrat étant :



les forces (A) et (C) s'exercent respectivement sur :

(A) : N α-aminé et N guanidique (1)

(C) : N guanidique (3)

Le cobalt de l'enzyme est fixé sur des groupements SH et les forces (B) qui s'exercent sur le cobalt du substrat (vraisemblablement fixé sur le carboxyle) proviennent d'autres groupements SH.

Les forces (A) et (B) s'exercent bien sur la partie de la molécule qui restera fixée sur l'enzyme, la force (C) s'exerçant au contraire de l'autre côté de la liaison sensible.

L'hypothèse que nous faisons sur la nature de la liaison métal-substrat dans le métallo-substrat nous est suggérée par la nécessité qu'il y a à ce que les forces (A) et (B) d'une part, (C) de l'autre s'exercent de part et d'autre de la liaison sensible et aussi par ce qui a lieu en présence de manganèse.

III/- Interchangeabilité des métaux :

Il est en général admis que les métaux susceptibles d'activer le même enzyme doivent uniquement leur interchangeabilité au fait que leurs propriétés électroniques sont voisines. Or il semble bien que la spécificité d'activation soit beaucoup plus stricte : des métaux très voisins du cobalt (Fe par exemple) sont sans action. Si le nickel est strictement interchangeable avec le cobalt, le manganèse dont les propriétés électroniques sont assez différentes, active également l'enzyme, mais avec un léger changement dans le mécanisme.

Le manganèse de l'enzyme est en effet, fixé sur des groupements COOH, les forces (A) s'exercent sans doute sur le carboxyle du substrat (la grande affinité de Mn pour les liaisons entre 2 carboxyles est connue), les forces (B), provenant toujours de groupements SH, s'exercent sur le Mn du substrat qui doit être ainsi fixé sur le N α -aminé et sur le N guanidique (1), les forces (C) s'exerçant toujours sur le N guanidique (3).

Cette légère différence explique celle des pH optimum de réactivation, qui se traduit par un aspect différent des courbes de l'activité en fonction du pH : l'activité étant la somme des réactions (1) (2) (3) et (4), son pH optimum est influencé par celui de chacune des réactions.

IV/- Réserves :

Il reste à trouver évidemment la nature du groupement de la protéine qui attire le N guanidique (3); il reste également à démontrer que nos conclusions sont valables dans les

conditions physiologiques ; nous avons en effet bien spécifié que notre étude est volontairement limitée à l'enzyme tel qu'on peut le reproduire expérimentalement par action d'ions métalliques sur l'enzyme inactivé.

Ces réserves mises à part, il reste possible que le schéma de réaction que nous avons proposé puisse s'appliquer aux autres enzymes à métal expérimentalement interchangeable, le schéma rendant en effet aussi bien compte de leur action que de celle de l'arginase.

- R E S U M E -

L'ensemble des recherches que nous avons poursuivies a eu pour but d'expliquer l'activation de l'arginase par un métal en démontrant l'existence de complexes Protéine-Métal et Protéine-métal-substrat et de définir les groupements fonctionnels du substrat et de la protéine qui interviennent dans la formation du dernier complexe.

I/- Matériel d'Etude :

Nous avons mis au point une méthode de purification de l'arginase, dérivée de la méthode de BACH, qui nous a permis de disposer régulièrement d'une solution enzymatique à 50% d'arginase et d'utiliser, pour certaines expériences, des quantités limitées d'une solution beaucoup plus pure, que l'on peut estimer contenir 90% d'enzyme.

II/- Rôle du métal dans l'activité de l'enzyme :

1) En reprenant systématiquement l'étude de la réactivation de l'enzyme par les métaux, nous avons établi que :

a) seuls le cobalt, le nickel et le manganèse réactivent notablement l'enzyme.

b) l'action du cobalt et celle du manganèse ne sont pas exactement semblables :

pH optimum	pour Co : 7,5	pour Mn: 9,5
constante $\frac{(P)(Me)}{(P-Me)}$	pour Co : $3 \cdot 10^{-4}M$	pour Mn: $4 \cdot 10^{-5}M$

un excès de cobalt inhibe l'enzyme, alors que celui-ci garde toute son activité en présence d'un excès de manganèse.

c) l'inhibition due à un excès de Co ou de Ni disparaît en présence d'un fort excès d'arginine.

d) le cuivre, et beaucoup moins nettement, le calcium et le Beryllium inhibent l'enzyme.

2) L'analyse des solutions d'enzyme après réactivation nous a montré l'existence de combinaisons métallo-protéidiques dont nous avons déterminé la teneur en métal : 0,5 % de cobalt ; 1% de manganèse.

3) Nous avons étudié la formation de ces complexes par spectrométrie dans le cas du cobalt, par la méthode d'équilibre de membrane dans celui du manganèse. Nous avons observé dans le premier que l'incubation d'enzyme inactivé dans une solution de cobalt produit une augmentation de la densité optique de la solution à $\lambda = 524 \text{ m}\mu$, croissant en fonction du temps et révélant la formation d'un complexe apoenzyme-métal. Nous avons montré que deux complexes pouvaient prendre naissance : l'un $(EM)_1$, peu chargé en cobalt actif, l'autre $(EM)_2$ plus riche en métal ne se forme que si $(Co) > 4,4 \cdot 10^{-3} M$ et inactif.

Dans le cas du manganèse, il se forme également deux complexes différents (le plus riche seulement si $(Mn) > 10^{-3} M$), mais qui présentent alors une même activité.

4) Lorsque l'on ajoute de l'arginine à une solution de sel de cobalt dans laquelle on a fait incuber de l'arginase inactivée, il se produit une nouvelle augmentation de la densité optique de la solution, qui persiste après la disparition par hydrolyse de l'arginine et même, parfois, s'intensifie encore.

Ce phénomène montre que la fixation du substrat sur l'enzyme se fait avec la participation du métal. Nous avons montré qu'il n'est pas fonction de la concentration totale en métal, mais uniquement de celle du complexe $(EM)_1$, que, dans le deuxième complexe $(EM)_2$, le métal ne réagit pas à l'addition de

substrat et enfin que le complexe EMS est deux fois plus riche en cobalt que $(EM)_1$.

5) Des acides aminés inhibiteurs compétitifs de l'arginase, la lysine et l'ornithine ont une action semblable à l'arginine sur les propriétés spectrales de solution d'apoarginase-Co. Au contraire, la valine, inhibiteur non compétitif, est sans action à ce point de vue.

6) Des corps de formule voisine de l'arginine tels que l'homoarginine (homologue supérieur), l'acide arginique, l'acide α -aminé- δ -hydroxy-valérianique et son homologue supérieur, peuvent également réagir sur le cobalt de l'enzyme : de même d'ailleurs que l'isomère optique de l'arginine, la D(-)-arginine. Tous sont des inhibiteurs compétitifs.

La confrontation de ces résultats avec la spécificité de substrat de l'enzyme nous a fait suggérer que l'azote α -aminé et l'azote guanidique lié à la chaîne valérianique étaient responsables de la liaison du métal et du substrat.

III/- Rôle du métal dans la structure de l'enzyme :

Nous avons étudié la variation d'activité apportée par blocage spécifique de certains groupements libres de la molécule enzymatique.

1) -SH :

L'iodoacétate inhibe totalement l'enzyme activé par le cobalt. Le ferricyanure, le p-chloromercuribenzoate, l'arsénite ont une action plus complexe mais l'action principale est une inhibition qui est d'autant plus importante que l'enzyme est plus pur. Avec un enzyme activé par le manganèse le blocage par ces réactifs est à faibles concentrations, sans conséquence, puis conduit à une inhibition simple qui ne dépasse jamais 50%. L'étude spectrophotométrique montre que les réactifs empêchent la formation du premier complexe $(EM)_1$ dans le cas du Cobalt.

2) -SS- Le cyanure est sans action. Le sulfite et la cystéine ont une action activatrice très nette, qui confirme les résultats précédents. Cependant les -SS- ont sans doute un rôle dans

la structure de l'enzyme car celui-ci est très sensible aux pH alcalins.

3) -NH₂

La guanidylation par O-méthyl-iso-urée, la benzoylation par le chlorure de benzoyle, l'acétylation par l'anhydride acétique, l'action de la formaldéhyde à pH 7, sont sans action sur l'activité de l'arginase.

4) Autres groupements :

Le sulfure d'éthyle dichloré (ypérite) à pH 6, inhibe légèrement l'enzyme; il n'empêche pas lorsqu'on le fait réagir sur l'enzyme inactivé la réactivation par le cobalt; en revanche il bloque totalement la réactivation par le manganèse.

La tyrosinase est sans action sur l'enzyme cependant que l'iode à faible concentration, à pH 7,4, supprime radicalement l'activité. La formaldéhyde à pH 11, enfin, inhibe également l'enzyme

B I B L I O G R A P H I E

1. AKASI S. - J. Biochem. Japan, 1937, 26, 129.
2. ANAGNOSTOPOULOS C. - Biochim. & Biophys. Acta, 1950, 4, 584.
3. ANDERSON A.B. - Biochem. J., 1945, 39, 139.
4. ANSON M.L. - J. Gen. Physiol., 1939, 23, 247.
5. ANSON M.L. - J. Gen. Physiol., 1939, 23, 321.
6. ANSON M.L. - J. Gen. Physiol., 1940, 24, 399.
7. ANSON M.L. - J. Gen. Physiol., 1941, 25, 355.
8. ANSON M.L., STANLEY W.M. - J. Gen. Physiol., 1940, 24, 679.
9. BACCARI V., AURICCHIO G. - Boll. soc. ital. biol. sper., 1946, 21, 49.
10. BACH S.J. - Nature, 1946, 158, 376.
11. BACH S.J. SIMON-REUSS I. - Biochim. & Biophys. Acta, 1953, 11, 396.
12. BANKS.T.E., BOURSNEILL J.C., FRANCIS G.E., HOPWOOD F.L., WORMALL A. - Biochem. J., 1946, 40, 745.
13. BARBU E., MACHEBOEUF M. - Intern. Congr. Biochem. Abstr. of Commun. 1st Congr. Cambridge, Engl. 1949, 145.
14. BARON E.S.G., MILLER Z.B., BARTLETT G.R., MEYER J., SINGER T.P. - Biochem. J., 1947, 41, 69
15. BARRON E.S.G., SINGER T.P. - J. Biol. Chem., 1945, 157, 221.
16. BERGMANN M. - Cité par DIXON M. (43), 1942.
17. BERGSTERMANN H., STEIN W. - Biochem. Z., 1944, 317, 217.
18. BERSIN T. - Z. physiol. Chem., 1933, 222, 177.
19. BERSIN T., LOGEMANN W. - Z. physiol. Chem., 1933, 220, 209.
20. BERTRAND G. - Compt. rend., 1897, 124, 1032.
21. BERTRAND G. - Bull. soc. chim. France, 1897, 17, 619.
22. BERTRAND G. - Ergeb. Vitamin- u. Hormonforsch. 1939, 11, 191.
23. BIER M., NORD F.F. - Arch. Biochem. and Biophys., 1951, 33, 320.

24. BLATHERWICK N.R., BISCHOFF F., MAXWELL L.C., BERGER J.,
SAHYUN M. - J. Biol. Chem., 1927, 72, 57.
25. BOBSTELSKY M., HEITNER C. - Bull. soc. chim. France, 1951, 494
26. BRACKMAN W. - Chem. Weekblad., 1951, 47, 948.
27. BRIGANDO J. - Compt.rend., 1952, 234, 2604;
235, 370.
28. CALVERY H.O., BLOCK W.D. - J. Biol. Chem., 1934, 107, 155.
29. CANNAN R.K., KIBRICK A. - J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 2314
30. CHANCE B. - "Modern trends in physiology and
biochemistry", E.S.G. BARRON édi-
teur, Académic Press, New-York,
1952, p. 25.
31. CHANUTIN N., LUDEWIG S., MASKET A.V. - J.Biol. Chem., 1942,
143, 737.
32. CHRISTENSEN H.E. - J. Biol. Chem., 1945, 160, 75.
33. CLARK H.T. - J. Biol. Chem., 1932, 97, 235.
34. COHN E.J. - Chem. Revs., 1941, 28, 395.
35. CORI C.F. - cité par DIXON M. (43), 1942.
36. CORYELL C.D., PAULING L. - J.Biol. Chem., 1940, 132, 769.
37. DAMODORAN M., NARAYANAN K. G.A. - Biochem. J., 1940, 34, 1449.
38. DAVIS S.B., ROSS W.F. - J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 1177
39. DERRIEN Y. - Biochim. & Biophys. Acta, 1952, 8,
631.
40. DICKENS F. - Biochem. J., 1933, 27, 1141.
41. DIXON M. - Chemical Defence Research Depart-
ment of the Ministry of Supply,
DIXON report N° 19, 1943.
42. DIXON M., NEEDHAM D.M. - Nature, 1946, 158, 432.
43. DUMAZERT C., POGGI R. - Bull. soc. chim. biol., 1939,
21, 1381.
44. EDLBACHER S., BAUR H. - Z. physiol. Chem., 1938, 254, 275.
45. EDLBACHER S., BONEM P. - Z. physiol. Chem., 1925, 145, 69.
46. EDLBACHER S., BURCHARD H. - Z. physiol. Chem., 1931, 194, 69.
47. EDLBACHER S., KRAUSS J., WALTER G. - Z. physiol. Chem., 1932,
205, 65.
48. EDLBACHER S., PINOSH H. - Z. physiol. Chem. 1937, 250, 241.
49. EDLBACHER S., ROTHLEH H. - Z. physiol. Chem. 1925, 148, 264.

50. EDLBACHER S., ZELLER A. - Z. physiol. Chem., 1936, 245, 65.
51. EDMAN P. - J. Biol. Chem., 1947, 168, 367.
52. EDSALL J.T. - Discussions Faraday Soc. N°13, 1953, 9.
53. ENGEL M.G., ENGEL F.L. - J. Biol. Chem., 1946, 167, 535.
54. von EULER H., JOSEPHSON K. - Z. physiol. Chem., 1926, 157, 122
55. FELIX K., MULLER H., DIRR K. - Z. physiol. Chem., 1928, 178, 192.
56. FELIX K., SCHNEIDER L. - Z. physiol. Chem., 1938, 255, 132.
57. FIESS H.A. - J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 3539.
58. FIESS H.A., KLOTZ I.M. - J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 887.
59. FRAENKEL-CONRAT H., BRANDON B.A., OLCOTT H.S. - J. Biol. Chem. 1947, 168, 99.
60. FRAENKEL-CONRAT H., OLCOTT H.S. - J. Biol. Chem., 1945, 161, 259
61. FRAENKEL-CONRAT H., OLCOTT H.S. - J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 34
62. FRENCH D., EDSALL J.T. - Advances in Protein Chem., 1945 2, 277.
63. FREUDENBERG K., DIRSCHEL W., EYER H. - Z. physiol. Chem., 1930, 187, 89.
64. GORDON J.J., QUASTEL J.N. - Nature, 1947, 159, 97.
65. GORDON J.J., QUASTEL J.N. - Biochem. J., 1948, 42, 337.
66. GORINI L. - Biochim. & Biophys. Acta, 1950, 6, 237.
67. GORINI L. - Biochim. & Biophys. Acta, 1951, 7, 318.
68. GORINI L., FELIX F., - Biochim. & Biophys. Acta, 1953, 10, 128.
69. GORINI L., FELIX F., FROMAGEOT C. - Biochim. & Biophys. Acta, 1953, 12, 283.
70. GORTER E., NANNINGA L. - Discussions Faraday Soc., N° 13, 1953, 205.
71. GOUDOT A. - Compt. rend., 1951, 232, 704 ; 232, 1078.
72. GOUDOT A. - Compt. rend., 1952, 235, 1396.
73. GRENN D.E., HERBERT D., SUBRAHMANYAN V. - J. Biol. Chem. 1940, 135, 795.
74. GREEN D.E., HERBERT D., SUBRAHMANYAN V. - J. Biol. Chem. 1941, 138, 327.

75. GREENBERG D.M. - Advances in Protein Chem., 1944, I, 120.
76. GREENBERG D.M. - "The Enzymes. Chemistry and mechanism of action" J.B. SUMNER, K.MYRBACK éditeurs, Academic Press; New-York; 1951, I, 893.
77. GREENBERG D.M., MOHAMED M.S. - Arch. Biochem. and Biophys., 1945, 8, 365.
78. GREENBERG D.M., SCHMIDT C.L.A. - J. Gen. Physiol., 1926, 8, 271.
79. GREENBERG D.M., WINNICK T. - J. Biol. Chem., 1940, 135, 761.
80. GREENSTEIN J.P. - J. Biol. Chem., 1935, 109, 529; 109, 541.
81. GREENSTEIN J.P. - J. Org. Chem. 1937, 2, 480.
82. GREENWALD I. - J. Biol. Chem. 1938, 124, 437.
83. GREENWALD I. - J. Phys. Chem., 1939, 43, 379.
84. GROSS E. - Z. Physiol. Chem., 1920, 112, 236.
85. HAAS W.J., SIZER I.W., LOOFBOUROW J.R. - Biochim. & Biophys. Acta, 1951, 6, 589.
86. HARTWELL J.L. - J. Natl. Cancer Inst., 1946, 6, 319
87. HELLERMAN L. - Physiol. Revs., 1937, 17, 454.
88. HELLERMAN L. - Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1939, 7, 165.
89. HELLERMAN L., CHINARD F.P., DIETZ V.R. - J. Biol. Chem., 1943, 147, 443.
90. HELLERMAN L., PERKINS M.E. - J. Biol. Chem., 1934, 107, 241.
91. HELLERMAN L., PERKINS M.E. - J. Biol. Chem., 1935, 112, 175.
92. HELLERMAN L., PERKINS M.E., CLARK W.M. - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 1933, 19, 855.
93. HELLERMAN L.; STOCK C.C. - J. Am. Chem. Soc., 1936, 58, 2654.
94. HELLERMAN L., STOCK C.C. - J. Biol. Chem., 1938, 125, 771.
95. HERRIOTT R.M. - Advances in Protein Chem., 1947, 3, 169.
96. HERRIOTT R.M., ANSON M.L., NORTHROP J.H. - J. Gen. Physiol., 1946, 30, 185.
97. van HEYNINGEN R. - cité par DIXON M. (43), 1942.
98. HOFMANN K., BERGMANN M. - J. Biol. Chem., 1940, 134, 225.
99. HOPKINS F.G. - Biochem. J., 1925, 19, 787.

100. HUENNEKENS F.M. - Exptl. Cell. Research, 1951, 2, 115
101. HUENNEKENS F.M., GREEN D.E. - Arch. Biochem. and Biophys., 1950, 27, 418 ; 27, 428.
102. HUGHES W.L. Jr. - cité par HERRIOT R.M. (92).
103. HUGHES W.L. Jr., SAROFF H.A., CARNEY A.L. - J. Am. Chem. Soc. 1949, 71, 2476.
104. HULTIN E. - Arkiv. f. Kemi, 1950, 2, 135 ; 2, 173.
105. HUNTER A. - Biochem. J., 1938, 32, 826.
106. HUNTER A., DOWNS C.E. - J. Biol. Chem., 1944, 155, 173.
107. HUNTER A., DOWNS C.E. - J. Biol. Chem., 1945, 157, 427.
108. HUNTER A., WOODWARD H.E. - Biochem. J., 1941, 35, 1298.
109. JOHNSON M.J., BERGER J. - Advances in Enzymol., 1942, 2, 69.
110. KARUSH F. - J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1246.
111. KAUSCHE G.A., HAHN F. - Z. Naturforsch., 1949, 46, 223.
112. KEILIN D., MANN T. - Proc. Roy. Soc. London, 1937, B. 122, 119.
113. KITAGAWA M. - J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1939, 15, 267.
114. KLEIN G., ZIESE W. - Z. physiol. Chem. 1932, 211, 23.
115. KLEIN G., ZIESE W. - Klin. Wochschr., 1935, 14, 205.
116. KLOTZ I.M. - Arch. Biochem. and Biophys., 1946, 2, 109.
117. KLOTZ I.M. - Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1949, 14, 97.
118. KLOTZ I.M. - Colloïd Chem., 1950, 7, 225.
119. KLOTZ I.M. - "Modern trends in physiology and biochemistry", E.S.G. BARRON éditeur Academic Press, New-York, 1952, p. 427.
120. KLOTZ I.M., CURME H.G. - J. Am. Chem. Soc., 1948., 70, 939.
121. KLOTZ I.M., FALLER I.L., URQUHART J.M. - J. Phys. & Colloïd Chem., 1950, 54, 18.
122. KLOTZ I.M., FIESS H.A. - J. Phys. & Colloïd Chem., 1951, 55, 101.
123. KOCHOLATY J., KOCHOLATY W. - Science, 1941, 94, 144.

- I24. KOLTHOFF I.M., LINGANE J.J. - "Polarography" Interscience Publishers, New-York; 1946, p. 161.
- I25. KONDO K., OGASAWARA Y. - Bull. Research Inst. Food Sci. Kyoto Univ. N° 10, 1952, 46.
- I26. KORNBERG A., OCHOA S., MEHLER A.H. - J. Biol. Chem., 1948, 174, 159.
- I27. KOSSELL A., DAKIN H.D. - Z. physiol. Chem., 1904, 41, 321; 42, 181.
- I28. KRAMPITZ L.O., WERKMAN C.H. - Biochem. J., 1941, 35, 595.
- I29. KREBS A.A., HENSELEIT K.Z. - Z. physiol. Chem., 1932, 210, 33.
- I30. KUBOWITZ F., LUTTGENS W. - Biochem. Z., 1941, 307, 170.
- I31. KUNITZ M. - J. Gen. Physiol., 1952, 35, 423.
- I32. LEHNINGER A.L. - Physiol. Revs., 1950, 30, 393.
- I33. LENTI C. - Boll. soc. ital. biol. sper., 1945, 20, 636.
- I34. LEUTHARDT F., KOLLER E. - Helv. Chim. Acta, 1934, 17, 1030.
- I35. LEVY M. - J. Biol. Chem., 1933, 99, 767 ; 1935 , 109, 365.
- I36. LI C.H. - J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 228.
- I37. LIEBEN F., LIEBER H. - Biochem. Z., 1934, 275, 38.
- I38. LOISELEUR J. - Compt.rend. soc. biol. 1942, 136, 435.
- I39. MAIN R.K., SCHMIDT C.L.A. - J. Gen. Physiol., 1935, 19, 127
- I40. MALMSTROM Bo.G. - Discussions Faraday Soc., N° 13 1953, 234.
- I41. MALMSTROM Bo. G. - Nature, 1953, 171, 392.
- I42. MANDL I., NEUBERG C. - Arch. Biochem. and Biophys., 1949 24, 274.
- I43. MANN C., LUTWAK-MANN T. - Ann. Rev. Biochem., 1944, 13, 25.
- I44. MASCHMANN E. - Ergeb. Enzymforsch., 1943, 9, 166
- I45. MASCHMANN E. - Biochem. Z., 1941, 319, 28.
- I46. MAUTHNER J. - Z. physiol. Chem., 1912, 78, 28.
- I47. MAVER M.E., THOMPSON J.W., GRECO A. - J. Natl. Cancer Inst. 1946, 6, 355.
- I48. MEHL J.W., PACOVSKA E., WINZLER R.J. - J. Biol. Chem., 1949 177, 13.

- I49. MELLON E.F., KORN A.H., HOOVER S.R. - J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 827.
- I50. MEYERHOF O., LOHMANN K. - Biochem. Z., 1928, 196, 22.
- I51. MICHAELIS L. - J. Biol. Chem., 1929, 84, 777.
- I52. MICHAELIS L., MENTEN M.L. - Biochem. Z., 1913, 49, 333.
- I53. MICHAELIS L., SCHUBERT M.P. - J. Biol. Chem., 1934, 106, 331.
- I54. MILLER G.L., ANDERSON K.J.I. - J. Biol. Chem., 1942, 144, 465.
- I55. MIRSKY A.E., ANSON M.L. - J. Gen. Physiol., 1936, 19, 451.
- I56. MOHAMED M.S. - Acta Chem. Scand., 1948, 2, 90.
- I57. MOHAMED M.S. - Acta Chem. Scand., 1949, 3, 56.
- I58. MOHAMED M.S. - Acta Chem. Scand., 1950, 3, 988.
- I59. MOHAMED M.S. - Acta Chem. Scand., 1951, 4, 978.
- I60. MOHAMED M.S. - Acta Chem. Scand., 1951, 4, 990.
- I61. MOHAMED M.S., GREENBERG D.M. - Arch. Biochem. and Biophys., 1945, 8, 349.
- I62. MOORE S., STEIN W.H., FRUTON F.S. - J. Org. Chem., 1946, 11, 675.
- I63. NAJJAR V.A. - "Phosphorus metabolism. A symposium on the role of phosphorus in the metabolism of plants and animals" W.D. Mac EIROY, B. GLASS, éditeurs. The John Hopkins Press, Baltimore, 1951, 1, 500.
- I64. NEUBERG C., MANDL I. - Arch. Biochem. and Biophys., 1948, 19, 149.
- I65. NORTHROP J.H. - cité par DIXON M. (43), 1942.
- I66. NORTHROP J.H., KUNITZ M. - J. Gen. Physiol., 1924, 7, 25 ; 1925, 9, 351; 1928, 11, 481.
- I67. OLCOTT H.S., FRAENKEL-CONRAT H. - Chem. Revs., 1947, 41, 151.
- I68. PASCAL P. - "Chimie Générale", Masson éditeur, Paris, 1951, 3, 458.
- I69. PETERS R.A., WAKELIN R.W. - Biochem. J., 1947, 41, 550.

- I70. PIRIE A. - Biochem. J., 1947, 41, 185.
- I71. PURR A., WEIL L. - Biochem. J., 1934, 28, 740.
- I72. PUTZEYS E. - Exposés ann. biochim. méd., 1950, II, 29.
- I73. RAPKINE L. - Compt. rend. soc. biol., 1933, II2, 790; II2, 1294.
- I74. REISSER O. - Z. physiol. Chem., 1906, 49, 210.
- I75. RICHARDS M.M., HELLERMAN L. - J. Biol. Chem., 1940, 134, 237.
- I76. RICHET C. - Compt. rend. soc. biol., 1894, 46, 525; 1897, 49, 743.
- I77. ROCHE J. - "Récentes acquisitions sur le rôle des métaux dans la structure et dans l'activité des enzymes à constituant métallique dissociable" Hermann éditeur, Paris, 1946.
- I78. ROCHE J. - Exposés ann. biochim. méd., 1949, 10, 78.
- I79. ROCHE J., ABUL FADL M.A.M. - Bull.soc. chim. biol., 1948, 30, 427.
- I80. ROCHE J., DERRIEN Y. - Exposés ann. biochim. méd., 1944, 5, 33.
Bull.soc. chim. biol., 1946, 28, 838.
- I81. ROCHE J., MOURGUE M. - Bull. soc. chim. biol., 1947, 29, 889.
- I82. ROCHE J., MOURGUE M., BARET R. - Compt. rend. soc. biol. 1950, 144, 1084.
- I83. ROCHE J., MOURGUE M., BARET R. - Bull. soc. chim. biol. 1951, 33, 1745.
- I84. ROCHE J., MOURGUE M., BARET R. - Compt. rend. soc. biol. 1953, 147, 462.
- I85. ROCHE J., THOAI Ng.v., BAI Ng.v. - Compt. rend. soc. biol., 1947, 141, 509.
- I86. ROCHE J., THOAI Ng.v., RICAUD P. - Compt. rend., 1953, 236, 427.
- I87. ROSNER L. - J. Biol. Chem., 1940, 132, 657.
- I88. ROSS W.F., STANLEY W.M. - J. Gen. Physiol., 1938, 22, 165.
- I89. ROSSI A., PONTECORNO M. - Boll. soc.ital. biol. sper., 1941 16, 649.

- I90. ROSSI A., RUFFO C. - Ricerca sci., 1940, II, 906.
- I91. ROSSI A., RUFFO C. - Boll. soc. ital. biol. sper., 1942, I7, 410.
- I92. SAKAGUCHI S. - J. Biochem. Japan, 1925, 5, 25
5, 133.
- I93. SALASKIN S., SOLOJEW L. - Z. physiol. Chem., 1931, 200, 259
- I94. SALASKIN S., SOLOJEW L. - Biochem. Z., 1932, 250, 503.
- I95. SCATCHARD G. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 660.
- I96. SCATCHARD G. - Am. Scientist. 1952, 40, 61.
- I97. SCHMIDT C.L.A. - "The Chemistry of the amino-acids and proteins", C. Thomas éditeur, Springfield, 1938, "Addendum" 1943
- I98. SCHUBERT M.P. - J. Am. Chem. Soc., 1931, 53, 3851; 1933, 55, 3336; 55, 4563.
- I99. SCHUTTE E. - Z. physiol. Chem., 1943, 279, 52.
200. SCOTT E.M., SANDSTROM W.M. - Arch. Biochem. and Biophys., 1943, I; 103.
201. SIZER I.W. - J. Biol. Chem., 1946, 163, 145
202. SIZER I.W., BRINDLEY C.O., WAGLEY P.F. - Intern. Congr. Bio. chem. Abstr. of Commun. 1st Congr Cambridge, Engl., 1949, 361.
203. SIZER I.W., TYTELL A.A. -- J. Biol. Chem., 1941, 138, 631.
204. SMITH E.L. - J. Biol. chem., 1946, 163, 15.
205. SMITH E.L. - J. Biol. Chem., 1948, 173, 571.
206. SMITH E.L. - J. Biol. Chem., 1948, 176, 21.
207. SMITH E.L. - Fédération Proc., 1949, 8, 581.
208. SMITH E.L. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1949, 35, 80.
209. SMITH E.L., BERGMANN M. - J. Biol. Chem., 1941, 138, 789, 1944, 153, 627.
210. SMITH E.L., HANSON H.T. - J. Biol. Chem., 1949, 179, 803.
211. SMITH E.L., LUMRY R. - Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1949, 14, 168.
212. SOUCHAY P., FAUCHERRE J. - Bull. soc. chim. France, 1947, 529.
213. SPRUNG M.M. - Chem. Revs. 1940, 26, 297.

214. STAHMANN M.A., FRUTON J.S., BERGMANN M. - J. Biol. Chem., 1946
164, 753.
215. STEVENS C.M., BUSH J.A., - J. Biol. Chem. 1950, 183, 139.
216. STOCK C.C., PERKINS M.E., HELLERMAN L. - J. Biol. Chem.,
1938, 125, 753.
217. STOPPANI A.O.M., ACTIS A.S., DEFERRARI J.O. - Anales asoc. quim
argentina, 1952, 40, 206.
218. TAKI M. - J. Biochem. Japan, 1941, 34, 399.
219. TANFORD C. - J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 2066.
220. TANFORD C. - J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 211.
221. TANFORD C. - J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 6036.
222. THOAI Ng.v. - "Spécificité des enzymes. Aperçu
critique sur la conception actuel-
le de la spécificité dans le domai-
ne de l'enzymologie, suivi d'un
exposé de recherches sur la chimie
des phosphatases", Thèse Doc. Sc-
Nat. Marseille; Declume éditeur,
Lons-le-Saulnier, 1946.
223. THOAI Ng.v., ROCHE J., ROGER M. - Biochim. & Biophys. Acta.
1947, 1, 61.
224. THOMAS K., KAPFHAMMER J., FLASCHENTRAGER B. - Z. physiol. Chem.
1922, 124, 75.
225. THOMPSON C.B. - Science, 1946, 104, 576.
226. THOMPSON C.B. - Experientia, 1948, 4, 432.
227. TOPP N.E., DAVIES C.W. - J. Chem. Soc., 1940, Pt I, 87.
228. UTZINO S., KAIJU M. - Z. physiol. Chem., 1939, 261, 137.
229. VAN SLYKE D.D. - Advances in Enzymol., 1942, 2, 33.
230. VAN SLYKE D.D., ARCHIBALD R.M. - J. Biol. Chem., 1946, 165, 293
231. VAN SLYKE D.D., CULLEN G.E. - J. Biol. Chem., 1914, 19, 211
232. WALDSCHMIDT-LEITZ E., SCHAFFNER A., KOCHOLATY W. - Naturwissens-
chaften, 1931, 19, 964.
233. WALDSCHMIDT-LEITZ E., SCHARIKOVA A., SCHAFFNER A. - Z. physiol.
Chem., 1933, 214, 75.
234. WALDSCHMIDT-LEITZ E., KOCHOLATY W. - Naturwissenschaften, 1933,
21, 848.
235. WALKER E. - Biochem. J., 1925, 19, 1082.

236. WARBURG O., CHRISTIAN W. - Biochem. Z., 1942, 310, 384.
237. WARBURG O., CHRISTIAN W. - Biochem. Z., 1943, 314, 148.
238. WARBURG O., SAKUMA S. - Pflügers Arch. ges. Physiol., 1923
200, 263.
239. WEBB E.C., van HEYNINGEN R. - Biochem. J., 1947, 41, 74.
240. WEBER C.J. - J. Biol. Chem., 1930, 86, 217;
88, 353.
241. WEIL L. - J. Biol. Chem., 1935, 110, 201.
242. WEIL-MALHERBE H. - Ann. Rev. Biochem., 1948, 17, 1.
243. WERNER J. - J. Chem. Soc. London, 1914, 105,
927.
244. WHERRY - Am. Mineralogist, 1929, 14, 54.
245. WILSON I.B. - Biochim. & Biophys. Acta, 1951, 7,
466.
246. WINNICK T., DAVIS A.R., GREENBERG D.M. - J. Gen. Physiol., 1939
23, 275.
247. WINTER J. - Compt.rend., 1948, 226, 704 ;
1950, 230, 626.
248. WOLFF H. - Biochem. Z., 1952, 322, 340.
249. WORMALL A. - J. Exptl. med., 1930, 51, 295.
250. WURMSER R. - "Cinétique des réactions biochi-
miques". Centre de Documentation
Universitaire. Paris, p. 50.
251. WYMAN J.Jr. - Federation Proc., 1948, 7, 502.

- TABLE des MATIERES -

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u> -	1
A - Définition et classification des enzymes à constituant métallique actif dissociable	2
B - Rôle du métal dans les enzymes à métal expérimentalement interchangeable	3
1) Données expérimentales	4
a) existence de liaisons enzyme-métal	4
b) existence de liaisons substrat-métal	5
2) Hypothèses faites sur le rôle du métal dans l'activité de l'enzyme	6
a) hypothèse du complexe métallique du substrat	6
b) hypothèse de la métallo-protéine enzymatique	8
3) Hypothèses faites sur le rôle du métal dans la structure de l'enzyme	11
4) Conclusion	
C - Objet du travail	13
1) Activation de l'arginase	13
2) Constitution de l'arginase	14
3) Inhibition de l'arginase	15
4) Conclusion	15
D - Plan des recherches	16

PREMIERE PARTIE : PURIFICATION de l'ARGINASE

I - METHODES d'ESSAI. DEFINITION d'une UNITE ARGINASIQUE	17
A - Choix des méthodes	17
B - Choix de la concentration en substrat	18
C - Pureté des préparations	19
D - Techniques	20
II - METHODES DE PURIFICATION	22
A - Méthodes existantes	22

B - Recherches personnelles	22
1) Critique des anciennes méthodes	22
2) Modifications de la méthode de Bach	23
a) fractionnement au sulfate d'ammonium	23
b) modification du traitement thermique	24
3) Fractionnement à l'alcool éthylique	24
4) Essais de purification par absorption	27
C - Résultats des analyses électrophorétiques	29
D - Conclusion	30
1) préparation usuelle	31
2) préparation hautement purifiée	32

DEUXIEME PARTIE : ROLE du METAL dans l'ACTIVITE de l'ENZYME 33

I - ACTION des IONS METALLIQUES DIVALENTS sur l'ACTIVITE de l'ENZYME 33

A - Résultats expérimentaux	34
1) Conditions d'inactivation	34
2) Conditions de réactivation	34
a) temps et température d'incubation	34
b) action des différents métaux à diverses concentrations	36
c) action du pH d'incubation	37
d) effet de la concentration en substrat	38
3) Inhibition par des métaux divalents	39
B - Discussion des résultats	
1) Métaux activateurs	40
2) Mécanisme général de l'activation et de l'inhibition	41

II - ESSAI d'ISOLEMENT et d'ANALYSE du COMPLEXE APOARGINASE-METAL 45

A - Technique d'étude	45
B - Résultats	46

III - ETUDE DU COMPLEXE APOARGINASE-METAL 49

A - Données générales sur les réactions protéine-métal	49
1) Méthode d'étude	49
2) Données stoechiométriques	51
3) Données énergétiques	51

B - Recherches personnelles	
1) Essai d'étude au polarographe	
2) Etude au spectrophotomètre des complexes Cobalt-apoarginase et Nickel-apoarginase	54
a) en fonction du temps	55
b) " de la concentration en métal	56
c) " de la concentration en arginase	58
d) conclusion	60
3) Etude au spectrophotomètre de la réaction Cuivre-arginase	62
4) Etude par la méthode d'équilibre par dia- lyse de la réaction Manganèse-apoarginase	62
C - Discussion des résultats	64
IV - ETUDE DU COMPLEXE APOARGINASE-METAL-SUBSTRAT	66
A - Recherches personnelles	66
1) Remarque préliminaire	66
2) Variation en fonction du temps	68
3) " " " de la concentration en substrat	71
4) " " " " en métal	72
5) " " " " en protéine	75
B - Discussion des résultats	77
1) Rôle du complexe EM dans la formation du composé ES	77
2) Conditions d'action du complexe (EM) ₁	77
3) Rôle du complexe (EM) ₂	78
4) Conclusion	79
V - ETUDE DU COMPLEXE APOARGINASE-METAL-INHIBITEUR	80
A - Recherches personnelles	81
B - Conclusion	82
VI - ETUDE DES COMPLEXES APOARGINASE-METAL-SUBSTANCES VOISINES de l'ARGININE	84
A - Spécificité de l'arginase	84
1) Groupement guanidique	84
2) " carboxyle	85
3) " α-aminé	85
4) Chaîne entre les groupements guanidique et carboxyle	85
5) Spécificité optique	86
6) Conclusion	86

B - Recherches personnelles	86
1) Techniques expérimentales	87
a) préparation de D(-)-arginine	87
b) protocole expérimental	88
2) Résultats	89

TROISIEME PARTIE : RAPPORT ENTRE LA CONSTITUTION DE L'ARGINASE et son ACTIVITE 94

INTRODUCTION 94

I - ROLE des GROUPEMENTS SULFHYDRYLES 98

A - Réactifs connus des groupements SH	98
1) Oxydants doux	98
2) Agents d'alkylation	99
3) Formateurs de mercaptides	99

B - Recherches personnelles	
1) Technique expérimentale	100
2) Etude de l'activité arginasique en présence de réactifs des groupements SH	
a) en fonction de la nature et de la concentration du réactif	100
b) d° du métal activateur	102
c) d° de l'état de pureté et d'activation de l'enzyme	103
3) Etude de la réactivation d'un enzyme inactivé dont les groupements SH ont été bloqués	104
a) réactivation	104
b) fixation de métal	105
4) Etude de la réversion des réactions	

C - Discussion des résultats	106
------------------------------	-----

D - Conclusion	109
----------------	-----

II - ROLE DES LIAISONS DISULFIDES 111

A - Réactifs connus	111
1) Réducteurs proprement dits	111
2) Sulfite et cyanure	112
3) Hydrolyse en milieu alcalin	112

B - Recherches Personnelles	112
-----------------------------	-----

C - Discussion des résultats	113
------------------------------	-----

III - ROLE des GROUPEMENTS AMINES	116
A - Réactifs connus	116
1) Acétylation par l'anhydride acétique	117
2) Benzoylation	117
3) Guanidylation	117
B - Recherches personnelles	118
1) Techniques expérimentales	
2) Résultats	
C - Discussion des résultats	119
IV - ROLE des AUTRES GROUPEMENTS	121
A - Groupements carboxyles	121
B - " phénol	122
C - Autres groupements	123
D - Recherches personnelles	123
1) Action de l'ypérite	123
2) Actions sur les groupements phénol	125
3) Autres réactions	126
4) Conclusions	126
CONCLUSIONS GENERALES	127
I - Mécanisme d'action de l'arginase	127
II - Précisions dans le cas de l'activité en présence de cobalt	128
III - Interchangeabilité des métaux	129
IV - Réserves	129
Résumé	131
Bibliographie	135

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Utilisation des isotopes des halogènes dans l'étude du
mécanisme des réactions**

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 9 mai 1954

Le Doyen de la Faculté des Sciences.

L'Assesseur,

ROBERT LEVY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

Le Vice-Président du
Conseil d'Université,

G. DAVY.

